

[WAS 02 AE CNE HOLT]
Rec'd PCTO 30 NOV 2004

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
 EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
 Intellectuelle
 Bureau international



(43) Date de la publication internationale
 11 décembre 2003 (11.12.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 03/102207 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ : **C12Q**
 (21) Numéro de la demande internationale :
 PCT/FR03/01613

(22) Date de dépôt international : 28 mai 2003 (28.05.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
 02/06631 30 mai 2002 (30.05.2002) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, F-75794 Paris
 Cedex 16 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :
GUICHARD, Gilles, François, Roger [FR/FR]; La
 Louvière, 5, rue du Milieu, F-67202 Wolfisheim (FR).
FOURNEL, Sylvie, Victorine, Lucienne [FR/FR]; 11 rue
 des Bornes, F-67200 Strasbourg (FR). **BIANCO, Alberto**
 [IT/FR]; 5, rue Saint Maurice, F-67000 Strasbourg (FR).
HOEBEKE, Johan, Félicien [BE/FR]; 21, rue de la
 Gare, F-67300 Schiltigheim (FR). **MULLER, Sylviane**
 [FR/FR]; 11, rue Beethoven, F-67600 Strasbourg (FR).

(74) Mandataires : **GROSSET-FOURNIER, Chantal** etc.;
 Grosset-Fournier & Demachy SARL, 54, rue Saint-Lazare,
 F-75009 Paris (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
 BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
 DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
 HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
 LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
 MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SK,
 SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,
 ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
 LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
 eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
 européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
 FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
 TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
 GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée
 dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: NOVEL MULTIMERIC MOLECULES, THE PREPARATION METHOD THEREOF AND USE OF SAME FOR THE PREPARATION OF MEDICAMENTS

(54) Titre : NOUVELLES MOLECULES MULTIMERIQUES, LEUR PROCEDE DE PREPARATION, ET LEUR UTILISATION POUR LA PREPARATION DE MEDICAMENTS

(57) Abstract: The invention relates to a multimeric molecule which can imitate a natural multimeric proteinaceous ligand. The invention also relates to a multimeric molecule as defined above which is characterised in that it has the following general formula: A-X_n, wherein: n is equal to 3, 4, 5 or 6; A denotes a chemical group which is functionalised by at least three amine functions or COOH functions; and X denotes a D, B-D or B(D)-D' group, in which B is a spacer and D and D' are peptides or pseudopeptides corresponding to a sequence which is derived from the ligand and selected from residual matter forming the interface with the receptor and which can interact with the receptor.

(57) Abrégé : La présente invention concerne une molécule multimérique capable de mimer un ligand multimérique protéique naturel. La présente invention concerne également une molécule multimérique telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle répond à la formule générale suivante : A-X_n dans laquelle : - n est égal à 3, 4, 5, ou 6, - A est un groupe chimique, fonctionnalisé par au moins trois fonctions amines ou fonctions COOH, - X représente un groupe D, B-D ou B(D)-D', dans lequel : * B est un bras espaceur, * D et D' sont des peptides ou pseudopeptides correspondant à une séquence dérivée du ligand, choisie parmi les résidus formant l'interface avec le récepteur, laquelle est susceptible d'interagir avec le récepteur.

WO 03/102207 A2

NOUVELLES MOLÉCULES MULTIMÉRIQUES, LEUR PROCÉDÉ DE PRÉPARATION, ET LEUR UTILISATION POUR LA PRÉPARATION DE MÉDICAMENTS

L'invention a pour objet de nouvelles molécules multimériques, leur procédé de préparation, ainsi que leur utilisation pour la préparation de médicaments.

L'invention a également pour objet des molécules capables d'activer ou d'inhiber la réponse immunitaire.

L'importance du couple CD40/CD40L dans la réponse immunitaire a amené de nombreux groupes à utiliser des anticorps dirigés contre ces deux molécules à des fins thérapeutiques, de manière à inhiber ou activer le système immunitaire. L'administration d'anticorps anti-CD40L a donné des résultats encourageants dans le traitement de maladies auto-immunes comme l'encéphalomyélite allergique expérimentale murine (un modèle de la sclérose en plaques humaine)(Howard et al., 1999) ou dans le traitement de rejet d'allogreffes rénales chez les singes (Kirk et al., 1999). Dans ces deux cas, les anticorps ont inhibé une activité néfaste du système immunitaire. Inversement, l'utilisation d'anticorps anti-CD40 agonistes a permis d'une part, d'améliorer fortement la réponse à des vaccins anti-tumoraux peptidiques chez la souris (Diehl et al., 1999) et d'autre part, d'augmenter l'efficacité des cellules T CD4⁺ dans la lutte contre des tumeurs murines (Sotomayor et al., 1999 ; Lode et al., 2000). Une régression de tumeur dans des modèles murins a été mise en évidence après injection de cellules dendritiques (CDs) transformées par un adénovirus codant le CD40L (Kikuchi et al., 2000). Enfin, une activation des cellules dendritiques par l'interaction de leur molécule CD40 avec CD40L est capable de protéger des souris d'une infection par un parasite, *Trypanosoma Cruzi* (Chaussabel et al., 1999). Dans tous ces travaux, la valence particulière de la molécule CD40L, qui s'associe sous forme de trimère pour former avec le CD40 des complexes hexavalents, rend difficile la production d'anticorps fonctionnels capables d'interférer avec les fonctions du couple CD40/CD40L. Le développement des adénovirus codant pour CD40L répond en partie à cet inconvénient. Cependant, leur utilisation n'est pas sans poser de problèmes chez l'homme. Enfin, la valence particulière du système rend difficile la découverte de molécules de synthèse capables d'interférer avec l'interaction CD40/CD40L.

L'invention a pour but de fournir des ligands multimériques conçus pour interférer dans des interactions protéine-protéine.

La présente invention a également pour but la préparation de molécules pouvant interférer avec des interactions multivalentes protéines-protéines.

La présente invention a également pour but la préparation de molécules pouvant moduler l'activité des membres des familles du TNF et du TNF-R.

La présente invention a pour but de fournir une molécule de synthèse agissant sur le système CD40/CD40L.

La présente invention a également pour but de fournir des molécules pouvant agir comme adjuvants ou immunosuppresseurs.

La présente invention concerne une molécule multimérique capable de mimer, avec une activité agoniste ou antagoniste, un ligand multimérique protéique naturel.

La présente invention concerne également une molécule multimérique capable de produire des effets différents de ceux produits par le ligand multimérique naturel appartenant à la famille du TNF, pouvant être bénéfiques dans une pathologie.

Par "molécule capable de mimer un ligand avec une activité agoniste", on désigne une molécule capable de reproduire une partie ou la totalité des fonctions du ligand naturel.

Par "molécule capable de mimer un ligand avec une activité antagoniste", on désigne des molécules une molécule capable d'inhiber une partie ou la totalité des fonctions du ligand naturel.

Par "ligand multimérique protéique naturel", on désigne toute protéine active sur son récepteur sous forme multimérique, à savoir homo-dimérique, homo-trimérique, homo-tétramérique ou homo-oligomérique, par autoassemblage non covalent.

La présente invention concerne une molécule multimérique telle que définie ci-dessus, capable de mimer un ligand de récepteur de la superfamille du TNF.

La "superfamille du TNF" désigne une famille de molécules ayant des caractéristiques structurales ou fonctionnelles proches de celles du TNF, ces molécules étant essentiellement impliquées dans la réponse immunitaire.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, la molécule multimérique de l'invention est caractérisée en ce que le ligand est un ligand de la molécule CD40.

La molécule CD40 est une molécule transmembranaire de 48 kDa qui appartient à la superfamille des "récepteurs au TNF". Elle est exprimée de manière constitutive par les cellules présentatrices de l'antigène telles que les cellules dendritiques, les

monocytes et les lymphocytes B. Elle interagit de manière trivalente avec CD40L (CD154) exprimé sur les cellules T activées, les leucocytes (monocytes/macrophages, cellules NK, basophiles, éosinophiles), les plaquettes activées ainsi que sur des cellules non hématopoïétiques (cellules musculaires lisses, cellules épithéliales, cellules endothéliales). A la surface de ces différentes cellules, son expression est inductible et persistante contrairement à son expression sur les cellules T activées qui n'est que transitoire. L'interaction CD40/CD40L est centrale dans le développement et le contrôle des réponses immunitaires humores et cellulaires.

La présente invention concerne une molécule multimérique telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle répond à la formule générale suivante :



dans laquelle :

- n est égal à 3, 4, 5 ou 6,
- A est un groupe chimique, fonctionnalisé par au moins trois fonctions amines ou fonctions COOH,
- X représente un groupe -D, -B-D ou -B(D)-D', dans lequel :
 - * B est un bras espaceur,
 - * -D et -D' sont des peptides ou pseudopeptides correspondant à une séquence dérivée du ligand, choisie parmi les résidus formant l'interface avec le récepteur du ligand, laquelle est susceptible d'interagir avec le récepteur.

Le groupe chimique A est un groupe chimique fonctionnalisé de telle sorte qu'il permet la liaison avec le groupe X. A est également appelé "molécule cœur".

Par "molécule cœur", on désigne un groupe chimique présentant un rôle central dans la présentation des n groupes X dans la molécule multimérique.

Par "bras espaceur", on désigne une chaîne organique utilisée pour éloigner le groupe D à la distance désirée de A.

Par "peptides ou pseudopeptides", on désigne un enchaînement de résidus d'acides aminés naturels ou non naturels, reliés entre eux par des liaisons amide. Un pseudopeptide est obtenu par remplacement d'une ou plusieurs liaisons amide dans le peptide par une liaison chimique de nature différente.

Par "séquence dérivée du ligand, choisie parmi les résidus formant l'interface avec le récepteur du ligand", on définit une séquence peptidique appartenant à la séquence primaire du ligand et dont le nombre d'acides aminés est compris entre 3 et 10, et dont

des études structurales (diffraction des rayons X, résonance magnétique nucléaire, modélisation moléculaire, mutagenèse dirigée) ont montré qu'au moins un des acides aminés la composant est en interaction non covalente (liaison hydrogène, interaction cation-pi, pont salin, interaction hydrophobe, van der Waals) avec un résidu d'acide aminé du récepteur.

La présente invention concerne également une molécule multimérique, caractérisée en ce qu'elle répond à la formule générale suivante :



dans laquelle :

- n est égal à 3, 4, 5 ou 6,
- A est un groupe chimique, fonctionnalisé par au moins trois fonctions amines ou fonctions COOH ou fonctions SH ou fonctions S-Npys (S-nitro-pyridinesulfényle) ou fonctions S-Pys (S-pyridinesulfényle), et est notamment différent d'une protéine,
- X représente un groupe -D, -B-D ou -B(D)-D', dans lequel :
 - * B est un bras espaceur,
 - * -D et -D' représentent des peptides ou pseudopeptides correspondant à une séquence dérivée d'un ligand, choisie parmi les résidus formant l'interface avec le récepteur du ligand, laquelle séquence est susceptible d'interagir avec le récepteur, ledit ligand étant choisi parmi les ligands de récepteurs de la superfamille du TNF, et notamment parmi les ligands suivants : EDA, CD40L, FasL, OX40L, AITRL, CD30L, VEGI, LIGHT, 4-1BBL, CD27L, LT α , TNF, LT β , TWEAK, APRIL, BLYS, RANKL et TRAIL.

La présente invention concerne également une molécule multimérique, caractérisée en ce qu'elle répond à la formule générale suivante :



dans laquelle :

- n est égal à 3, 4, 5 ou 6,
- A est un groupe chimique, fonctionnalisé par au moins trois fonctions amines ou fonctions COOH, et est notamment différent d'une protéine,
- X représente un groupe -D, -B-D ou -B(D)-D', dans lequel :
 - * B est un bras espaceur,
 - * -D et -D' représentent des peptides ou pseudopeptides correspondant à une séquence dérivée d'un ligand, choisie parmi les résidus formant l'interface avec le

récepteur du ligand, laquelle séquence est susceptible d'interagir avec le récepteur, ledit ligand étant choisi parmi les ligands de récepteurs de la superfamille du TNF, et notamment parmi les ligands suivants : EDA, CD40L, FasL, OX40L, AITRL, CD30L, VEGI, LIGHT, 4-1BBL, CD27L, LT α , TNF, LT β , TWEAK, APRIL, BLYS, RANKL et TRAIL.

L'expression "-D et -D'" correspondant à une séquence dérivée d'un ligand, laquelle séquence est susceptible d'interagir avec le récepteur" peut être définie comme suit : les séquences -D et -D' sont choisies sur la base de données structurales disponibles (diffraction des rayons X ou modélisation moléculaire et mutagenèse dirigée) pour leurs implication dans l'interaction avec le récepteur correspondant. Ainsi dans la protéine naturelle, tout ou partie des résidus de ces séquences sont en interaction (liaison hydrogène, liaison hydrophobe, liaison H, liaison cation-Pi, ponts salin, interactions de van der Waals) avec une partie du ou des récepteurs correspondants. Néanmoins les peptides isolés -D ou -D' peuvent avoir des affinités pour le récepteur trop faibles pour être mesurées. Le gain d'affinité sera apporté par la multimérisation telle que décrite dans la présente invention.

Les ligands de la superfamille du TNF sont choisis dans la liste fournie par Locksley et al. (2001) et sont notamment les suivants :

Nom du ligand	Références
EDA	Laurikkala J, <i>Development</i> (2002) May;129(10):2541-53
CD40L	J. Singh et al., <i>Protein Science</i> (1998), 7, 1124-1135
FasL	Starling et al., <i>Biochemistry</i> (1998), 37, 3723-3726
OX40L	Weinberg AD., <i>Trends Immunol</i> (2002) Feb;23(2):102-9 (review)
AITRL	Kwon B et al., <i>J Biol Chem</i> (1999) Mar 5; 274(10):6056-61
CD30L	Opat S, Gaston JS. <i>Autoimmunity</i> (2000); 33(1):45-60 (review)
VEGI (ou TL1)	Migone TS et al., <i>Immunity</i> (2002) Mar; 16(3):479-92
LIGHT	Wang J et al., <i>J Immunol</i> (2001) Nov 1;167(9):5099-105
4-1BBL	Kwon B, <i>Trends Immunol</i> (2002) Aug;23(8):378-80
CD27L	Jacquot S., <i>Immunol Res</i> (2000); 21(1):23-30
LT α (TNFB)	Banner et al., <i>Cell</i> (1993), 73, 431-445
TNF	Eck et al., <i>J. Biol. Chem.</i> (1989), 264, 17595-17605
Lt β	Browning JL, <i>Cell</i> (1993) Mar 26; 72(6):847-56
TWEAK	Chicheportiche Y et al., <i>J Biol Chem</i> (1997) Dec 19; 272(51):32401-10

APRIL	Yu G et al., <i>Nat Immunol</i> (2000) Sep; 1(3):252-6
BLYS	Liu Y et al., <i>Cell</i> (2002) Feb 8; 108(3):383-94
RANKL	Ito S et al., <i>J Biol Chem</i> (2002) Feb 22; 277(8):6631-6
TRAIL	Mongkolsapaya J et al., <i>Nat Struct Biol</i> (1999) Nov; 6(11):1048-53

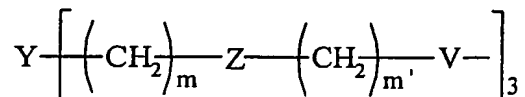
Selon un mode de réalisation avantageux de la présente invention, la molécule de l'invention est caractérisée en ce que -D et -D' représentent des peptides dérivés du ligand du récepteur CD40 humain ou murin (CD40L), lesdits peptides appartenant à la séquence primaire du ligand CD40L de CD40 et dont le nombre d'acides aminés est compris entre 3 et 10.

Une molécule multimérique avantageuse de l'invention est une molécule multimérique caractérisée en ce que A présente une symétrie C_3 .

On définit une molécule de symétrie C_3 de la manière suivante : une molécule appartient au groupe C_3 si elle possède un axe d'ordre 3 (cf. définition dans "Physical Chemistry", PW Atkins, Oxford University Press, 1998, p430).

La présente invention concerne une molécule multimérique telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce que :

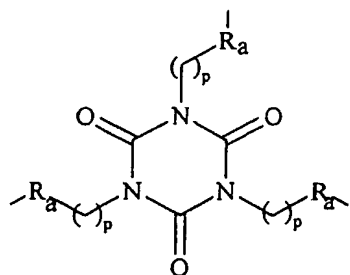
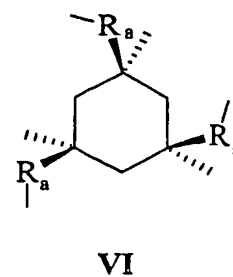
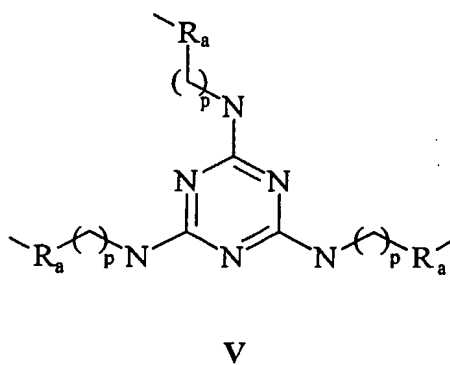
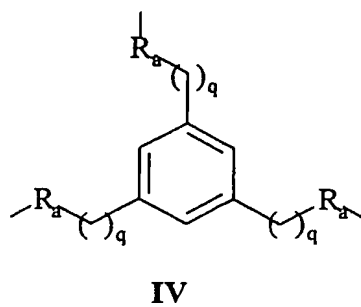
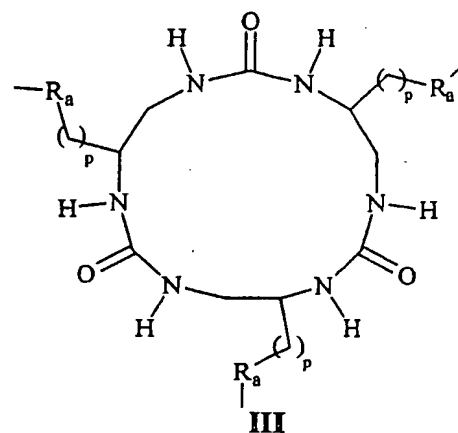
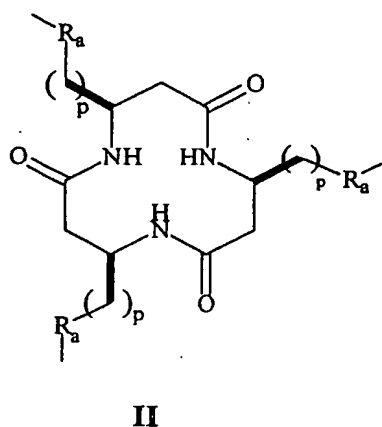
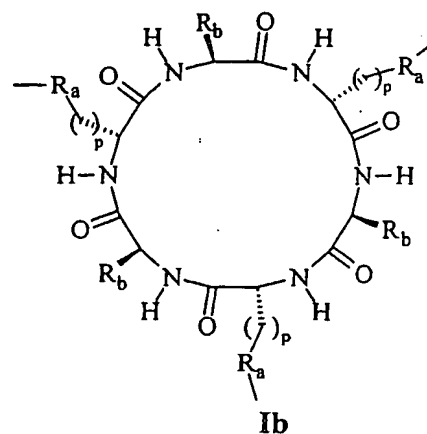
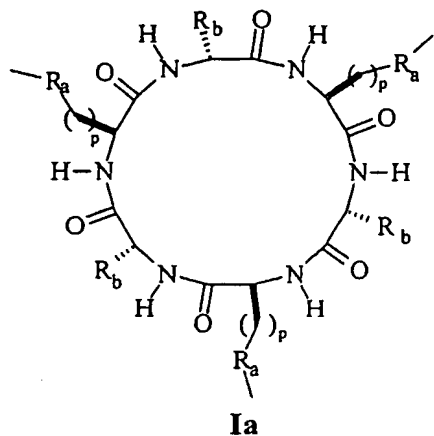
- soit A est un radical branché de symétrie C_3 de formule générale suivante :

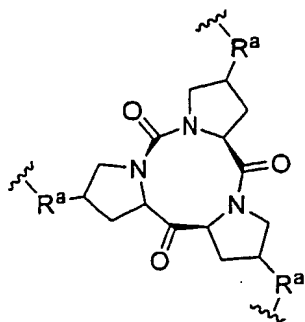


dans laquelle :

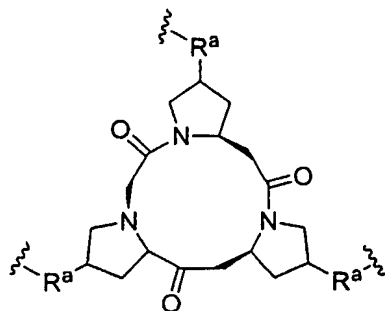
- * m et m' sont des nombres entiers compris de 1 à 5,
- * V représente un groupe -NH- ou -CO- formant une liaison amide avec X,
- * Z représente un atome d'oxygène ou un groupe CH_2 ,
- * Y représente soit un atome d'azote, soit un groupe R-C- soit un groupe R-CONH-C-, dans lesquels R peut être un groupe alkyle avec 1 à 10 atomes de carbone, un groupe alkényle avec 1 à 10 atomes de carbone, un groupe alkynyle avec 1 à 10 atomes de carbone, un groupe aryle avec 5 à 12 atomes de carbone, un groupe aralkyle avec 5 à 14 atomes de carbone ou un groupe hétéroaryle avec 1 à 10 atomes de carbone, lesdits groupes pouvant être non substitués ou substitués par 1 jusqu'à 6 substituants choisis parmi les groupes -COOH, -NH₂, -CONH₂ ou alkoxy,

- soit A est un radical C₃ cyclique répondant à l'une des formules générales suivantes :

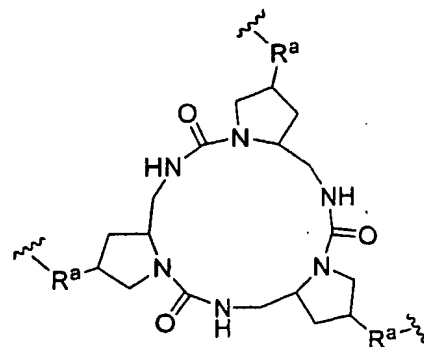




VIIb



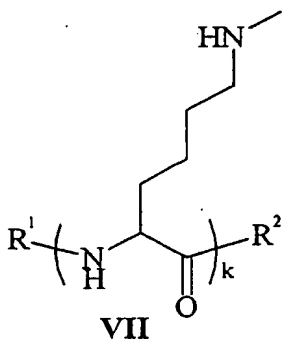
Vlc



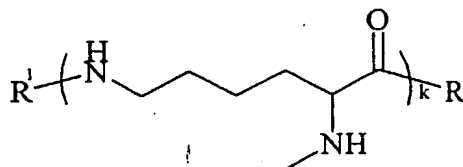
VId

dans lesquelles :

- * R_a représente soit un groupe $-NH-$ soit un groupe $-CO-$ formant une liaison amide avec X ,
 - * R_b représente la chaîne latérale d'un acide aminé protéinogénique,
 - * p est un nombre entier compris de 1 à 4,
 - * q est un nombre entier compris de 0 à 4,
- soit A est un radical branché non symétrique répondant aux formules générales suivantes :



VII

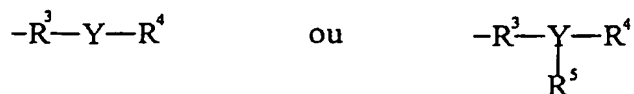


VIII

dans lesquelles :

- * k représente 3, 4, 5 ou 6,
- * R^1 représente soit un atome d'hydrogène, soit un résidu d'acide aminé choisi parmi les acides aminés protéinogéniques, soit un groupement $RCO-$, $ROCO-$ ou $RNHCO-$, R étant tel que défini ci-dessus,
- * R^2 représente soit un groupe $-NH_2$, soit un groupe $-NHR$, soit un résidu d'acide aminé choisi parmi les acides aminés protéinogéniques, R étant tel que défini ci-dessus,

- B répond à l'une des formules générales suivantes :



dans lesquelles :

- * Y représente une chaîne alkyle C₁-C₁₀ ou un groupement alkynyle ou alkényle ou aryle ou aralkyle ou hétéroaryle,
 - * R³ représente soit un groupe -NH- lorsque V ou R_a est un groupe -CO-, soit un groupe -CO- lorsque V ou R_a est un groupe -NH-,
 - * R⁴ et R⁵ représentent indépendamment l'un de l'autre un groupe -CO- ou un groupe -NH-,
- -D et -D' sont des peptides ou pseudo-peptides correspondant à une séquence dérivée du ligand qui est en interaction avec le récepteur.

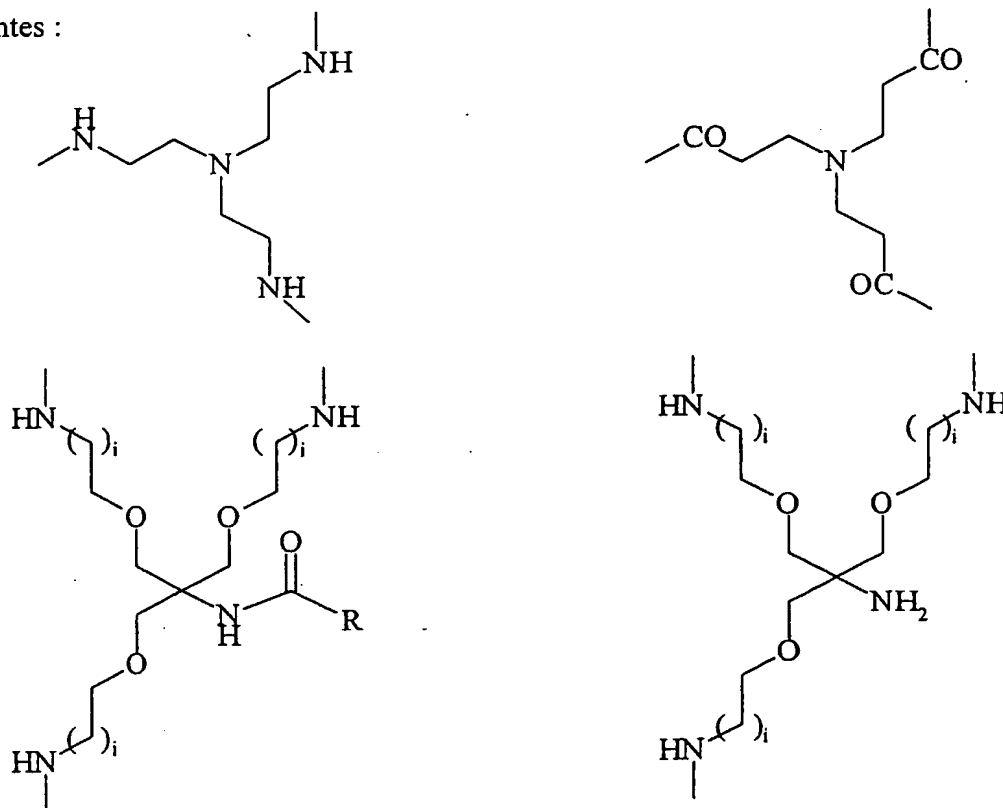
La présente invention concerne également une molécule telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce que -D et -D' représentent des résidus dérivés du ligand du récepteur CD40 humain ou murin (CD40L), choisis parmi les suivants :

Lys¹⁴³-Gly-Tyr¹⁴⁵, Tyr¹⁴⁵-Gly-Lys¹⁴³,
 Lys¹⁴³-Gly-Tyr-Tyr¹⁴⁶, Tyr¹⁴⁶-Tyr-Gly-Lys¹⁴³,
 Lys-Pro-Arg, Lys-ψ(CH₂NH)Pro-Arg,
 Arg²⁰⁰-Phe-Glu-Arg-Ile-Leu-Leu-Arg²⁰⁷,
 Arg²⁰⁷-Leu-Leu-Ile-Arg-Glu-Phe-Arg²⁰⁰,
 Arg²⁰⁰-Phe-Glu-Arg-Ile²⁰⁴, Ile²⁰⁴-Arg-Glu-Phe-Arg²⁰⁰,
 Arg²⁰³-Ile-Leu-Leu-Arg²⁰⁷, Arg²⁰⁷-Leu-Leu-Ile-Arg²⁰³,
 Cys²¹⁸-Gly-Gln-Gln-Ser-Ile²²³, Ile²²³-Ser-Gln-Gln-Gly-Cys²¹⁸,
 Gly²⁰⁰-Ser-Glu-Arg-Ile-Leu-Leu-Lys²⁰⁷,
 Lys²⁰⁷-Leu-Leu-Ile-Arg-Glu-Ser-Gly²⁰⁰,
 Gly²⁰⁰-Ser-Glu-Arg-Ile²⁰⁴, Ile²⁰⁴-Arg-Glu-Ser-Gly²⁰⁰,
 Arg²⁰³-Ile-Leu-Leu-Lys²⁰⁷, Lys²⁰⁷-Leu-Leu-Ile-Arg²⁰³,
 Cys²¹⁸-Glu-Gln-Gln-Ser-Val²²³, Val²²³-Ser-Gln-Gln-Glu-Cys²¹⁸,

ou parmi des peptides hybrides constitués d'au moins deux acides aminés consécutifs de deux des séquences définies ci-dessus, notamment les peptides de séquences Arg²⁰³-Ile²⁰⁴-Tyr¹⁴⁵-Tyr¹⁴⁶ ou Arg²⁰³-Ile²⁰⁴-Tyr¹⁴⁶-Tyr¹⁴⁵-Gly¹⁴⁴-Lys¹⁴³,
 ou parmi des fragments des séquences susmentionnées,

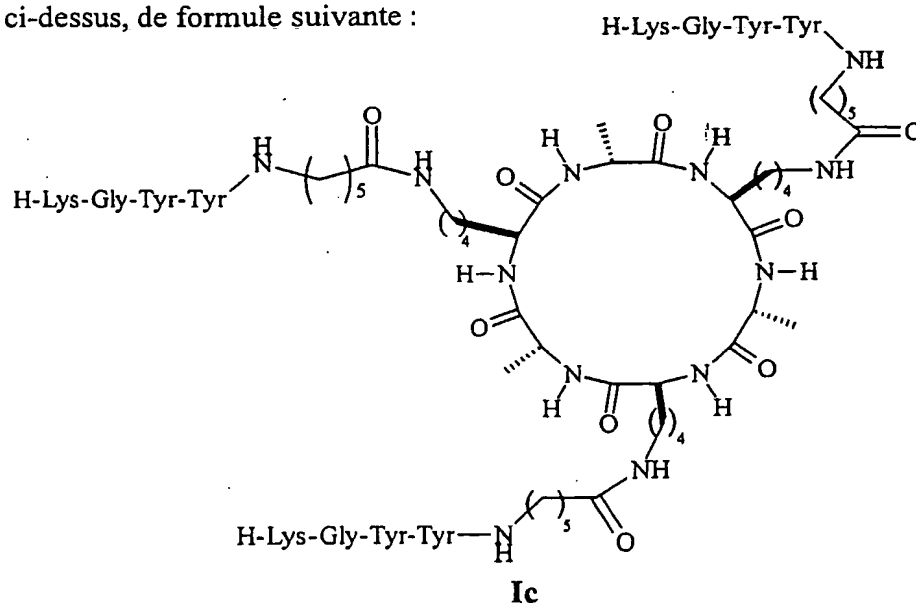
les acides aminés pouvant être indifféremment de configuration L ou D.

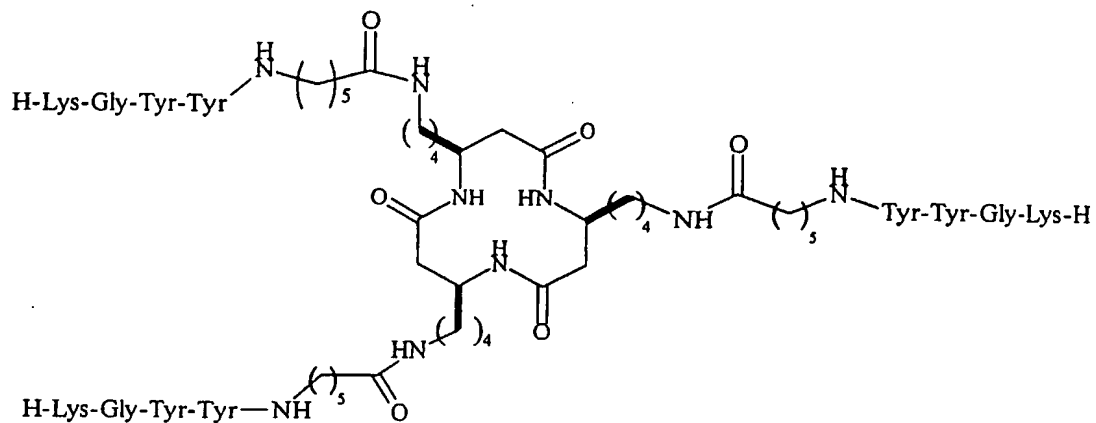
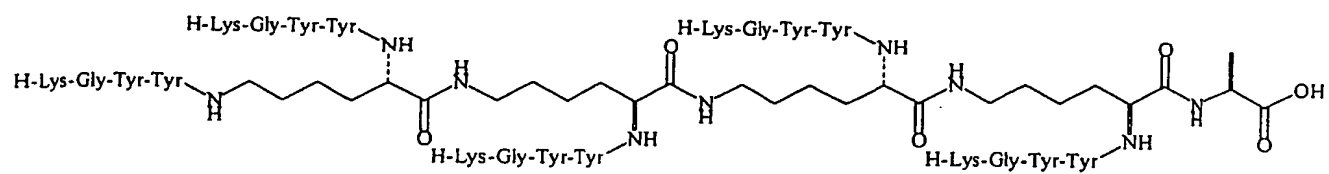
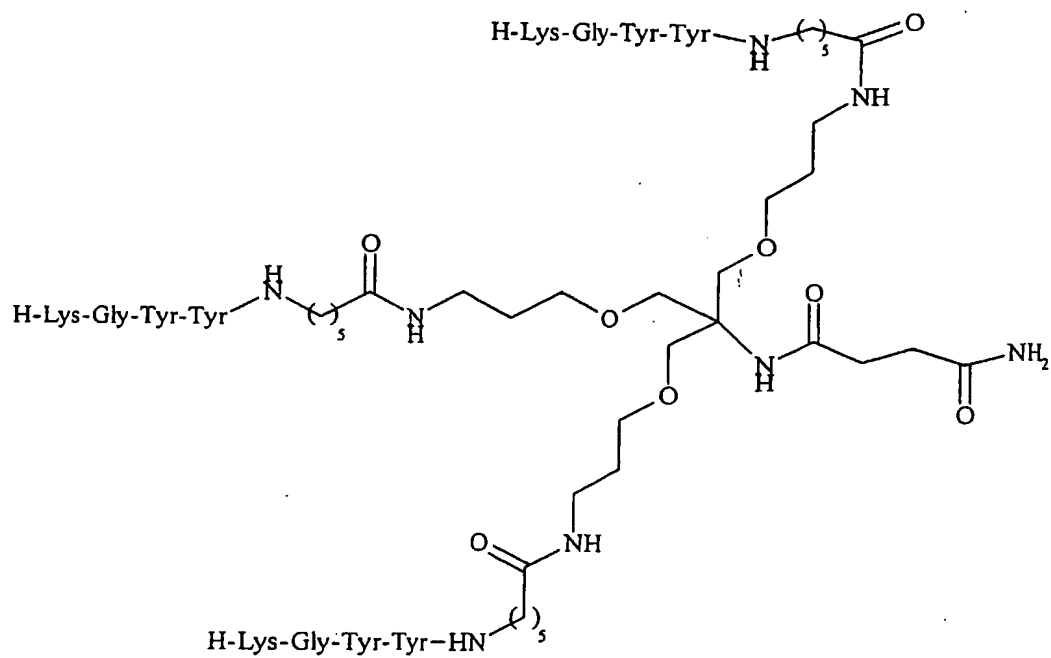
Selon un mode de réalisation avantageux de la présente invention, la molécule telle que définie ci-dessus est caractérisée en ce que A répond à l'une des formules suivantes :



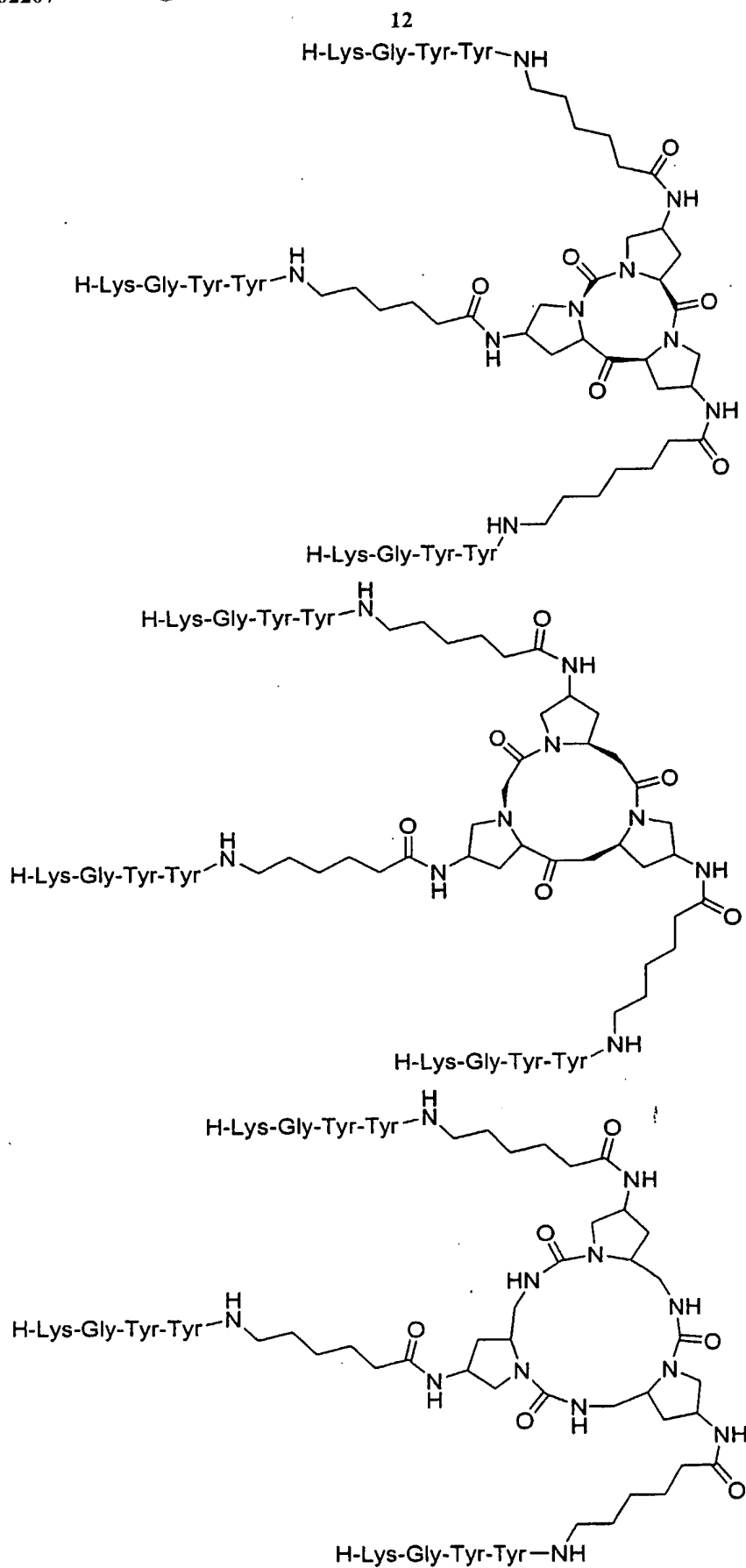
dans lesquelles i représente un nombre entier supérieur ou égal à 1.

Une molécule avantageuse de la présente invention est une molécule telle que définie ci-dessus, de formule suivante :



**IIa**

12



La présente invention concerne également une composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend, à titre de substance active une molécule multimérique telle que définie ci-dessus, en association avec un vecteur pharmaceutiquement acceptable.

La présente invention concerne également une composition vaccinale, caractérisée en ce qu'elle comprend, à titre de substance active une molécule multimérique telle que définie ci-dessus, en association avec un adjuvant pharmaceutiquement acceptable.

La présente invention concerne également l'utilisation de molécules multimériques telles que définies ci-dessus, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies impliquant l'inhibition ou l'activation de la réponse immunitaire.

La réponse immunitaire doit être inhibée au cours des maladies inflammatoires (rhumatismes inflammatoires), des maladies auto-immunes, des réactions d'hypersensibilités en général et des allergies en particulier, des rejets de greffes, des réactions du greffon contre l'hôte.

La réponse immunitaire doit être activée dans les vaccinations en général, dans l'immunothérapie des cancers, dans les maladies bactériennes ou virales induisant une immunosuppression (rougeole, SIDA, virus de l'herpes, cytomégalo virus...).

La présente invention concerne également l'utilisation telle que mentionnée ci-dessus, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies impliquant l'inhibition de la réponse immunitaire, telles que les rejets de greffes ou les maladies auto-immunes.

Les maladies impliquant l'inhibition de la réponse immunitaire comprennent les maladies auto-immunes telles que les diabètes, la sclérose en plaques, le lupus érythémateux disséminé ou l'arthrite rhumatoïde, les rejets de greffes, notamment dans le cadre d'allogreffes, de xénogreffes ou les réactions du greffon contre l'hôte, ainsi que les réactions d'hypersensibilités telles que les allergies, notamment le rhume des foins et les dermatites atopiques, ou les granulomes.

Les composés selon la présente invention, utilisés dans le cadre de l'inhibition de la réponse immunitaire, peuvent être administrés par voie intraveineuse, par les voies muqueuses (orales, aériennes, nasales, vaginales), par voie sous-cutanée, intradermique ou épicutanée.

La présente invention concerne également une composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend un composé selon la présente invention, pour le

traitement de pathologies impliquant l'inhibition de la réponse immunitaire, lequel composé est présent dans la composition pharmaceutique en quantités telles qu'il peut être administré à raison d'environ 100 ng à environ 5 mg par jour et par individu.

La présente invention concerne également l'utilisation telle que définie ci-dessus, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies impliquant l'augmentation de la réponse immunitaire, telles que les cancers ou les infections parasitaires, bactériennes ou virales.

Les cas impliquant l'activation de la réponse immunitaire comprennent les vaccinations en général, notamment les vaccins contre la grippe ou contre les maladies infantiles, l'immunothérapie des cancers, notamment dans le cadre de mélanomes ou de cancers à métastases, ou les maladies bactériennes ou virales induisant une immunosuppression, notamment dans le cadre de la rougeole, du SIDA, du virus de l'herpès ou du cytomégalovirus.

Les composés selon la présente invention, utilisés dans le cadre de l'activation de la réponse immunitaire, peuvent être administrés par voie intraveineuse, par les voies muqueuses (orales, aériennes, nasales, vaginales), par voie sous-cutanée, intradermique ou épicutanée.

La présente invention concerne également une composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend un composé selon la présente invention, pour le traitement de pathologies impliquant l'activation de la réponse immunitaire, lequel composé est présent dans la composition pharmaceutique en quantités telles qu'il peut être administré à raison d'environ 100 ng à environ 5 mg par jour et par individu.

La présente invention concerne également l'utilisation telle que définie ci-dessus, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de maladies non liées au système immunitaire, telles que les lymphomes, l'athérosclérose ou les thromboses.

La présente invention concerne un procédé de préparation sur support solide d'une molécule multimérique telle que définie ci-dessus, dans laquelle A est un radical C₃ cyclique et répond à l'une des formules Ia, Ib, II, VIb, VIc ou VId telles que définies ci-dessus, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- la formation d'un précurseur linéaire de A, lequel précurseur est constitué d'un enchaînement d'acides aminés formant une chaîne peptidique en croissance, synthétisée par des cycles successifs de couplage entre des résidus d'acides aminés N-protégés, dont trois portent un groupe R_a de type amine, et la fonction amine de la chaîne

peptidique en croissance, et de déprotection, le premier résidu d'acide aminé étant accroché sur un support solide,

- la cyclisation du précurseur linéaire de A protégé susmentionné,
- le clivage des susdits groupes protecteurs, pour libérer les susdites fonctions amines protégées,
- le couplage des trois fonctions amines libérées avec un bras espaceur B N-protégé,
- la déprotection du bras espaceur B et le couplage des fonctions amines libérées du bras espaceur B, avec un peptide D déjà formé ou formé in situ par l'assemblage séquentiel des résidus d'acides aminés correspondant au peptide D, et
- le clivage de la molécule du support solide, après la suppression de tous les groupements protecteurs présents sur les chaînes latérales fonctionnalisées du peptide D, afin d'obtenir la molécule multimérique selon l'invention.

Les composés comprenant un groupe A cyclique présentant une symétrie C_3 et répondant aux formules générales Ia, Ib, II, VIb, VIc ou VId sont obtenus par synthèse sur support solide selon le procédé décrit ci-après. Le groupe A est d'abord construit sur support solide par synthèse de son précurseur linéaire et cyclisation. Ainsi, un premier résidu d'acide aminé, dont la fonction acide est convenablement protégée (ester d'allyle par exemple), est accroché sur le support par une réaction d'amination réductrice, en utilisant une résine fonctionnalisée par un aldéhyde (résines commerciales). Le précurseur linéaire de A est ensuite assemblée par cycles successifs de couplage (de manière classique en synthèse de peptide) avec un acide aminé N-protégé (N-Fmoc-Xaa-OH par exemple, Xaa représentant un acide aminé ou un peptide en croissance quelconque) et de déprotection (pipéridine 20% dans du DMF pour le clivage d'un groupe Fmoc). Les techniques de lavage et de filtration de la résine ainsi que de déprotection du groupement Fmoc sont celles couramment utilisées en synthèse peptidique en phase solide. Les trois acides aminés portant une chaîne R_a (cf. formules Ia, Ib ou II) sont fonctionnalisés sur leur chaîne latérale par une fonction amine qui est protégée par un groupement protecteur orthogonal aux autres (TEOC ou méthyltrityl par exemple). A la fin de l'assemblage, le dernier groupement N-protecteur est clivé (en présence de pipéridine 20% dans du DMF dans le cas d'un groupement Fmoc) et la protection de l'ester C-terminal est clivée. Le précurseur linéaire est alors cyclisé "tête à queue" ("head to tail") en présence d'un réactif de couplage (classique en synthèse peptidique) et d'une base tertiaire comme la DIEA ou la collidine par exemple. La

réaction de cyclisation peut être suivie par un test colorimétrique tel que le test de Kaiser (Kaiser et al., 1970). A la fin de la cyclisation, les groupements protecteurs des acides aminés possédant une fonction amine protégée sont clivés et le bras espaceur, convenablement protégé (Fmoc-Ahx (acide 6-amino hexanoïque)-COOH par exemple), est couplé en présence d'un agent de couplage sur les trois fonctions amines libres. A l'issue de ce couplage, le groupement protecteur du bras espaceur est clivé et le peptide D est assemblé par des méthodes classiques de synthèse peptidique. A la fin de la synthèse et une fois le dernier groupe protecteur enlevé, la molécule est clivée de la résine, par exemple par traitement à l'acide trifluoroacétique, lyophilisée après précipitation à l'éther et purifiée par HPLC préparative en phase inverse sur une colonne C18 par exemple.

La présente invention concerne également un procédé de préparation en solution d'une molécule multimérique telle que définie ci-dessus, dans laquelle A est un radical C_3 cyclique et répond à l'une des formules Ia, Ib, II, VIb, VIc ou VId telles que définies ci-dessus, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- la formation d'un précurseur linéaire de A, lequel précurseur est constitué d'un enchaînement d'acides aminés formant une chaîne peptidique en croissance, synthétisée par des cycles successifs de couplage entre des résidus d'acides aminés N-protégés, dont trois portent un groupe R_a de type amine, et la fonction amine de la chaîne peptidique en croissance, et de déprotection,
- la cyclisation du précurseur linéaire de A protégé susmentionné,
- le clivage des susdits groupes protecteurs, pour libérer les susdites fonctions amines protégées,
- le couplage des trois fonctions amines libérées avec un peptide -D-B correspondant à un bras espaceur B lié à un peptide D protégé,
- la déprotection des groupements protecteurs présents sur le peptide D, afin d'obtenir la molécule multimérique selon l'invention.

La présente invention concerne un procédé de préparation d'une molécule multimérique telle que définie ci-dessus, dans laquelle A est un radical C_3 branché et répond à l'une des formules IV, V, VI ou VIa telles que définies ci-dessus, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- le couplage des trois fonctions amines du radical A de formule IV, V, VI ou VIa avec un bras espaceur B protégé,
- la déprotection du bras espaceur B,

- l'assemblage du bras espaceur B déprotégé avec des acides aminés protégés entrant dans la constitution d'un peptide D, par des cycles successifs de couplage, de purification et de déprotection des acides aminés susmentionnés,
- la déprotection du dernier acide aminé entrant dans la constitution du peptide D, afin d'obtenir la molécule multimérique selon l'invention.

Les composés de l'invention comprenant un groupe A qui est un radical branché de symétrie C_3 , et correspondant notamment aux formules IV, V, VI ou VIa, peuvent être synthétisés en phase solide ou en solution selon la procédure détaillée ci-après.

Lorsque le radical A est fonctionnalisé par des fonctions amines, le bras espaceur convenablement protégé (Boc-Ahx-OH par exemple) est couplé en présence d'un réactif de couplage selon les procédés de synthèse peptidique sur les trois fonctions amines de A. A l'issue de ce couplage dont la réaction peut être suivie par chromatographie sur couche mince, le produit est isolé et purifié sur colonne de silice selon les techniques classiques de synthèse organique. Le groupement Boc est ensuite clivé par l'acide trifluoroacétique, et le peptide D est assemblé en solution par étapes successives de couplage, purification et déprotection du groupement Boc. A la fin de la synthèse, les groupements protecteurs sur les chaînes latérales sont clivés par hydrogénation catalytique ou bien par traitement à l'acide fluorhydrique HF. La molécule trimérique est ensuite purifiée par HPLC préparative en phase inverse sur une colonne C18 par exemple.

Lorsque le radical A est fonctionnalisé par des fonctions acides carboxyliques, le bras espaceur convenablement protégé (hexaméthylène diamine mono protégée par un groupement Boc par exemple) est couplé en présence d'un réactif de couplage selon les procédés de synthèse peptidique sur les trois fonctions acide carboxylique de A. A l'issue de ce couplage dont la réaction peut être suivie par chromatographie sur couche mince, le produit est isolé et purifié sur colonne de silice selon les techniques classiques de synthèse organique. Le groupement Boc est ensuite clivé par l'acide trifluoroacétique, et le peptide D est assemblé en solution par étapes successives de couplage, purification et déprotection du groupement Boc. A la fin de la synthèse, les groupements protecteurs sur les chaînes latérales sont clivés par hydrogénation catalytique ou bien par traitement à l'acide fluorhydrique HF. La molécule trimérique est ensuite purifiée par HPLC préparative en phase inverse sur une colonne C18 par exemple.

La présente invention concerne un procédé de préparation sur support solide d'une molécule multimérique telle que définie ci-dessus, dans laquelle A est un radical branché non symétrique répondant à l'une des formules VII ou VIII telles que définies ci-dessus, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- le greffage d'une lysine sur un support solide, chacune des deux fonctions amines de la lysine, respectivement en position α et ϵ , étant protégée respectivement par des groupes protecteurs différents et orthogonaux,
- l'allongement de la chaîne peptidique formée à partir de la lysine, à la longueur désirée, par couplages et déprotections successifs
 - * soit uniquement des fonctions amines en position α afin d'obtenir le radical A de formule VII, avec des fonctions amines protégées en position ϵ ,
 - * soit uniquement des fonctions amines en position ϵ afin d'obtenir le radical A de formule VIII, avec des fonctions amines protégées en position α ,
- le couplage des fonctions amines déprotégées en position ϵ dans le radical A de formule VII ou en position α dans le radical A de formule VIII, avec un bras B protégé,
- l'assemblage du bras espaceur B déprotégé avec un peptide D déjà formé ou formé in situ par l'assemblage séquentiel des résidus d'acides aminés correspondant au peptide D, et
- le clivage de la molécule ainsi obtenue du support solide, après la suppression de tous les groupements protecteurs présents sur les chaînes latérales fonctionnalisées du peptide D.

Les composés de l'invention comprenant un groupe A¹ qui est un radical branché non symétrique, peuvent être synthétisés en phase solide selon la procédure détaillée ci-après.

On utilise une résine Fmoc-Xaa-Wang (Xaa peut être n'importe quel acide aminé ou peptide en croissance) ou une résine Fmoc-Rink-amide commerciale. Après clivage du groupement Fmoc avec de la pipéridine 25% dans du DMF (diméthylformamide)(2 \times 15 min), l'acide aminé, portant la chaîne amine fonctionnalisée, convenablement protégée de manière orthogonale notamment par un groupement Fmoc ou un groupement Mtt (méthyltrityle) dans le cas d'une fonction amine (Fmoc-Lys(Mtt)-OH par exemple), est activé avec un agent de couplage en présence d'une base tertiaire et

couplé sur la résine. Le groupement Mtt ou Fmoc est clivé sélectivement par traitement avec une solution (6 ml) de 85% de dichlorométhane (DCM), de 10% de triisopropylsilane (TIS), de 5% d'acide trifluoroacétique (TFA) (3×3 min)(cas du Mtt), ou de pipéridine 25% dans du DMF (cas du Fmoc). La chaîne est allongée à la longueur désirée (k étant un nombre entier compris entre 3 et 6) par couplages et déprotections successives en utilisant le même acide aminé (Fmoc-Lys(Mtt)-OH par exemple). Après déprotection du dernier groupement Fmoc ou Mtt, le reste des groupements protecteurs (Mtt ou Fmoc) est clivé et le bras espaceur convenablement protégé (Fmoc-Ahx-COOH par exemple) est couplé en présence d'un agent de couplage sur les fonctions amines libres. A l'issue de ce couplage, le groupement protecteur du bras espaceur est clivé et le peptide D est assemblé par des méthodes classiques de synthèse peptidique. A la fin de la synthèse et une fois le dernier groupe protecteur enlevé, le peptide est clivé de la résine (traitement à l'acide trifluoroacétique par exemple), lyophilisé après précipitation à l'éther et purifié par HPLC préparative en phase inverse sur une colonne C18 par exemple.

DESCRIPTION DES FIGURES

La Figure 1A représente le modèle moléculaire du complexe trivalent CD40-CD40L.

La Figure 1B représente des résidus de CD40L situés à l'interface et essentiels à l'interaction avec CD40. Les résidus portant une étoile appartiennent à la deuxième sous-unité CD40L formant l'interface.

La Figure 2 représente la structure des ligands trimériques de l'invention.

Les Figure 3A, 3B, 3C et 3D représentent l'expression de CD95 à la surface des cellules du lymphome de Burkitt BL41 lors de l'interaction CD40-CD40L, mesurée par cytométrie de flux. Les surfaces grisées représentent le contrôle isotypique et la courbe gris clair représente la fluorescence proportionnelle à la quantité d'anti-CD95 fixé sur les cellules.

La Figure 3A représente l'expression de CD95 lorsque les cellules BL41 susmentionnées ($5.10^5/\text{ml}$) sont incubées avec des fibroblastes 3T6 non transfectés.

La Figure 3B représente l'expression de CD95 lorsque les cellules BL41 susmentionnées ($5.10^5/\text{ml}$) sont incubées avec des fibroblastes 3T6 transfectés par CD40L.

La Figure 3C représente l'expression de CD95 lorsque les cellules BL41 susmentionnées ($5.10^5/\text{ml}$) sont incubées avec des fibroblastes 3T6 non transfectés, en présence d'anticorps anti-CD40L.

La Figure 3D représente l'expression de CD95 lorsque les cellules BL41 susmentionnées ($5.10^5/\text{ml}$) sont incubées avec des fibroblastes 3T6 transfectés par CD40L, en présence d'anticorps anti-CD40L.

La Figure 4A représente l'inhibition de l'incorporation de thymidine tritiée des cellules du lymphome de Burkitt BL41 (4.10^5 cellules/ml) après 24h de culture en présence de différentes concentrations de ligands (L4, L7, L7-1, L7-2 ou L7-3) ou de CD40L soluble (CD40Ls). Les colonnes noires correspondent à une concentration égale à 50 μM ; les colonnes avec des hachures horizontales correspondent à une concentration égale à 5 μM ; les colonnes blanches correspondent à une concentration

égale à 0,5 μM ; les colonnes grises correspondent à une concentration égale à 100 nM et les colonnes quadrillées correspondent à une concentration égale à 50 nM.

La thymidine tritiée a été ajoutée à une concentration de 1 $\mu\text{Ci/puits}$ ($0,8 \cdot 10^5$ cellules/puits) pendant les 8 dernières heures de la culture et l'incorporation de thymidine tritiée mesurée à l'aide d'un compteur β en scintillation gazeuse.

La Figure 4B représente le pourcentage d'apoptose spécifique des cellules du lymphome de Burkitt BL41 ($4 \cdot 10^5$ cellules/ml) après 24h de culture en présence de différentes concentrations des ligands L4, L4bis, L8, L7, L9 et L11. Les colonnes noires correspondent à une concentration égale à 50 μM ; les colonnes blanches correspondent à une concentration égale à 25 μM ; les colonnes avec des hachures horizontales correspondent à une concentration égale à 12,5 μM et les colonnes avec des hachures obliques correspondent à une concentration égale à 6 μM .

L'apoptose est mesurée en cytométrie de flux après marquage avec de l'annexine V FITC et de l'iodure de propidium. Les cellules marquées avec l'annexine V seule ou avec l'annexine V et l'iodure de propidium sont considérées comme apoptotiques. Le pourcentage d'apoptose spécifique est calculé par la formule suivante :

$$\left[(\% \text{ apoptose avec le ligand} - \% \text{ apoptose sans ligand}) / (100 - \% \text{ apoptose sans ligand}) \right] \times 100$$

La Figure 5A représente le pourcentage de souris MRL-^{lpr} (Koopman et al., 1998) vivantes à différents âges après injection intraveineuse de 100 $\mu\text{L/souris}$ de PBS contenant ou non 100 μg de ligand L4. Les injections ont eu lieu à l'âge de 7, 9 et 11 semaines. La courbe en trait plein correspond à une injection de PBS sans le ligand L4 et la courbe en trait pointillé correspond à une injection de PBS avec le ligand L4.

La Figure 5B représente le pourcentage de souris MRL-^{lpr} présentant des anticorps anti-ADN (évalué par un test ELISA) dans leur sérum à différents âges après le même traitement que dans la Figure 5A. Les colonnes blanches correspondent à une injection de PBS sans le ligand L4 et les colonnes noires correspondent à une injection de PBS avec le ligand L4.

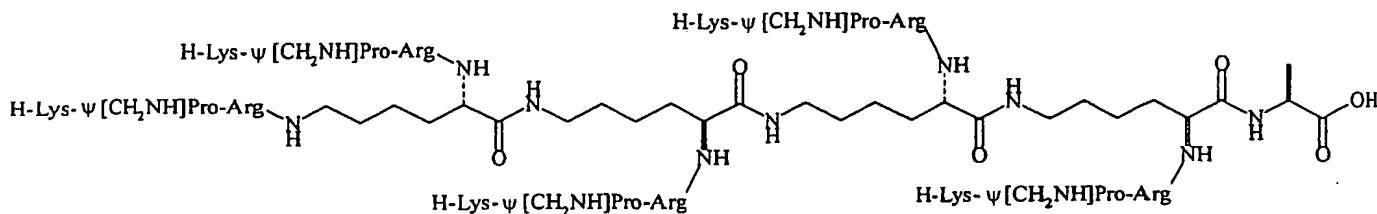
La Figure 5C représente le pourcentage de souris MRL-^{lpr} présentant une protéinurie positive dans leurs urines à différents âges après le même traitement que dans la figure 5A. Les colonnes blanches correspondent à une injection de PBS sans le ligand L4 et les colonnes noires correspondent à une injection de PBS avec le ligand L4.

* La totalité des souris traitées par le ligand L4 sont mortes.

PRÉPARATION DES COMPOSÉS L1, L2, L3 ET L4 :

A) PRÉPARATION DU COMPOSÉ L1

Le composé L1 répond à la formule suivante :

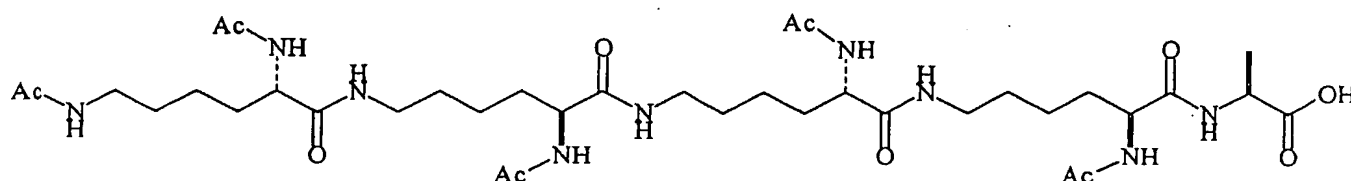


Le composé L1 est synthétisé en phase solide sur une résine Wang-Ala-Fmoc commerciale sur une échelle de 200 μ mol. Après clivage du groupement Fmoc avec 25% de pipéridine dans la DMF (diméthyleformamide) (2×15 min), l'acide aminé Fmoc-Lys(Mtt)-OH (3 équivalents) activé avec Bop (benzotriazol-1-yloxy-tris(diméthylamino)phosphonium hexafluorophosphate)(3 équivalents), HOBt (1-hydroxybenzotriazole)(3 équivalents) et DIEA (diisopropyléthylamine)(9 équivalents) dans la DMF est couplé à la résine (2×15 min). Les techniques de lavage et de filtration de la résine ainsi que de déprotection du groupement Fmoc sont celles couramment utilisées en synthèse peptidique en phase solide. Le groupement Mtt (4-méthyltrityle) est clivé avec une solution (6 ml) de 85% DCM (dichlorométhane), 10% TIS (triisopropylsilane), 5% TFA (acide trifluoroacétique) (3×3 min). Le deuxième et le troisième Fmoc-Lys(Mtt)-OH sont couplés avec la même stratégie et les mêmes quantités de réactifs ci-dessus. La quatrième lysine est couplée sous forme de Fmoc-Lys(Fmoc)-OH. Après déprotection du groupement Fmoc avec 25% pipéridine dans la DMF (2×15 min), les acides aminés Fmoc-Arg(Pbf)-OH et Fmoc-Pro-OH (15 équivalents) activés avec Bop (15 équivalents), HOBt (15 équivalents) et DIEA (45 équivalents) dans la DMF sont couplés pendant 15 minutes (chaque couplage est répété 2 fois). La liaison amide réduite entre la lysine et la proline est formée sur la résine en utilisant la réaction d'amination réductrice de l'aldéhyde Boc-Lys(Boc)-CHO (2,5 équivalents) en présence de NaBH_3CN (2,5 équivalents) dans de la DMF contenant 1% d'acide acétique (2×1 h). Le produit est clivé de la résine avec une solution (5 ml) de 80% TFA, 10% DCM, 10% TIS pendant 2 heures. Après précipitation dans de l'éther froid, le produit brut est lyophilisé dans un mélange H_2O /acétonitrile/acide acétique (80/15/5). Le produit est contrôlé par spectrométrie de masse (MALDI-MS (Matrix assisted laser desorption

ionisation mass spectrometry)) et HPLC analytique et purifiée par HPLC préparatif sur colonne C₁₈ en utilisant un gradient d'acétonitrile dans l'eau.

B) PRÉPARATION DU COMPOSÉ L2

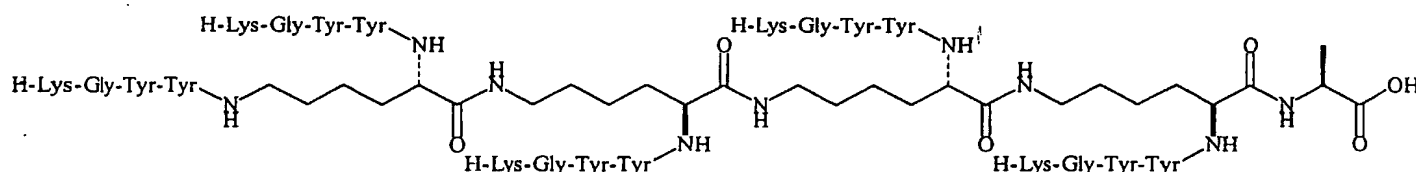
Le composé L2 répond à la formule suivante :



Le composé L2 est synthétisé comme L1 jusqu'à la quatrième lysine. Après déprotection du groupement Fmoc avec 25% de pipéridine dans la DMF (2 × 15 min), les groupes aminés libres sont acétylés avec une solution d'anhydride acétique (1 ml) dans du DCM (2 ml) en présence de DIEA (1 ml) pendant 15 minutes. Le produit est clivé de la résine avec une solution (5 ml) de 80% TFA, 10% DCM, 10% TIS pendant 2 heures. Après précipitation dans de l'éther froid, le produit brut est lyophilisé dans un mélange H₂O/acétonitrile/acide acétique (80/15/5). Le produit est contrôlé par spectrométrie de masse (MALDI-MS) et HPLC analytique et purifiée par HPLC préparatif sur colonne C₁₈ en utilisant un gradient d'acétonitrile dans l'eau.

C) PRÉPARATION DU COMPOSÉ L3

Le composé L3 répond à la formule suivante :

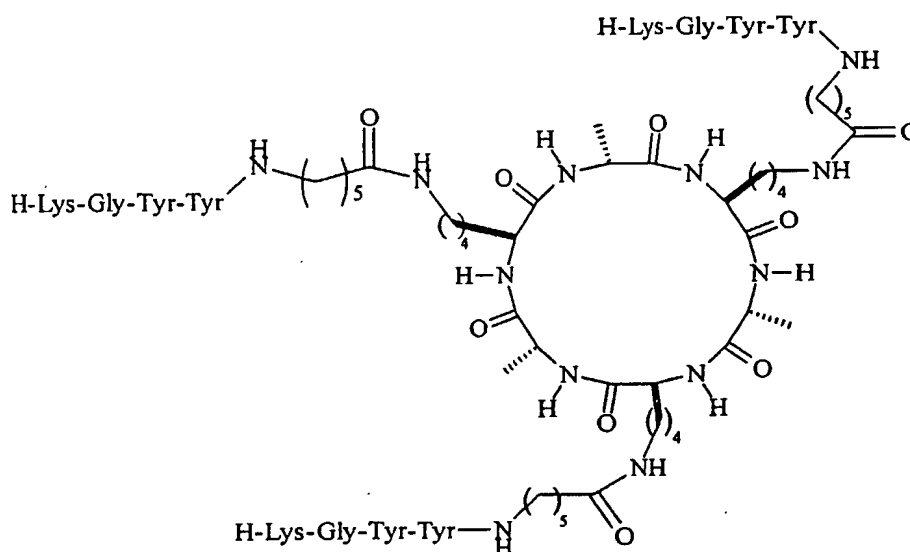


Le composé L3 est synthétisé comme L1 jusqu'à la quatrième lysine. Après déprotection du groupement Fmoc avec 25 % pipéridine dans la DMF (2 × 15 min), les acides aminés Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH et Fmoc-Lys(Boc)-OH (15 équivalents) activés avec Bop (15 équivalents), HOBT (15 équivalents) et DIEA (45 équivalents) dans la DMF sont couplés pendant 15 minutes (chaque couplage est répété 2 fois). Le produit est clivé de la résine avec une solution (5

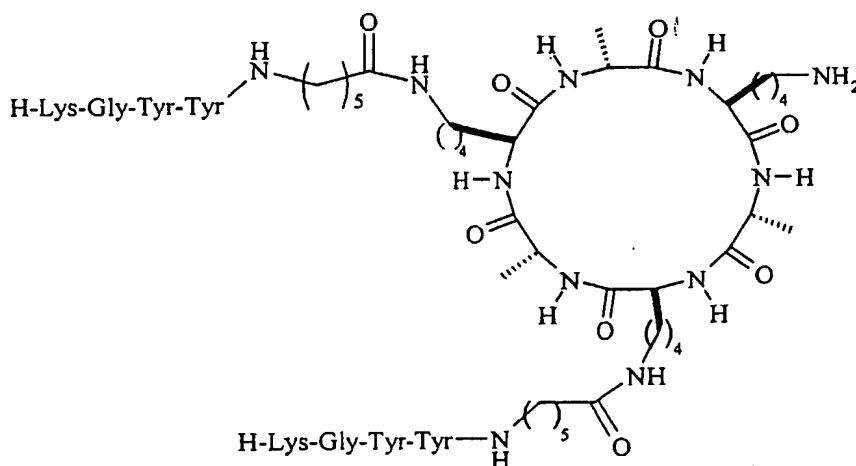
ml) de 80% TFA, 10% DCM, 10% TIS pendant 2 heures. Après précipitation dans de l'éther froid, le produit brut est lyophilisé dans un mélange H₂O/acétonitrile/acide acétique (80/15/5). Le produit est contrôlé par spectrométrie de masse (MALDI-MS) et HPLC analytique et purifiée par HPLC préparatif sur colonne C₁₈ en utilisant un gradient d'acétonitrile dans l'eau.

D) PRÉPARATION DES COMPOSÉS L4 ET L4bis

Le composé L4 répond à la formule suivante :



Le composé L4bis répond à la formule suivante :



1) Préparation des synthons

a) Boc-(D)Ala-OAll

L'acide aminé Boc-D-Ala-OH (1,89 g, 10 mmol) est solubilisé dans 70 ml d'ACN (acétonitrile) et la solution refroidie à 0°C. Après avoir ajouté 1,5 ml (1,2 équivalents) de DBU (1,8-diazabicyclo[5,4,0]undecen-7-ene), une solution de bromure d'allyle (0,72 ml, 1 équivalent), dans 10 ml d'acétonitrile, est ajoutée goutte à goutte pendant environ 15 minutes. La réaction, suivie par chromatographie en couche mince (CCM) se déroule à température ambiante pendant 21 heures. Après évaporation de l'acétonitrile, le produit brut est dissous dans l'acétate d'éthyle et la solution organique est lavée avec NaHCO₃ 5%, H₂O, KHSO₄ 1N et H₂O. Après séchage sur Na₂SO₄ et évaporation de la phase organique, le produit est récupéré sous forme d'huile avec un rendement de 73%. Le produit est caractérisé par spectroscopie RMN et FT-IR, et utilisé pour la réaction suivante sans purifications ultérieures.

b) HCl×H-(D)Ala-OAll

L'acide aminé Boc-D-Ala-OAll (1,67 g ; 7,3 mmol) est solubilisé dans une solution de 5 ml de HCl (4 M) dans du dioxane sous atmosphère d'argon pendant 30 minutes. La réaction est suivie par CCM. Après évaporation de la solution acide, le produit est obtenu solide sous vide avec un rendement de 90%. Le produit est caractérisé par spectroscopie RMN et FT-IR, et utilisé pour la réaction suivante sans purifications ultérieures.

c) Fmoc-Lys(Mtt)-OAll

L'acide aminé Fmoc-Lys(Mtt)-OH (625 mg, 1 mmol) est solubilisé dans 5 ml de dichlorométhane (DCM) en présence de HOBt (1 équivalent) et EDC×HCl (EDC : 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide méthiodide)(1,1 équivalents). Après 5 minutes, l'allyle alcool (1 équivalent) et la DMAP (4-diméthyl aminopyridine)(0,1 équivalents) sont ajoutés. Après 27 heures, 0,5 équivalents de HOBt, EDC×HCl, allyle alcool et 0,1 équivalents de DMAP sont ajoutés. La réaction se déroule au total pendant 44 heures. Après évaporation du dichlorométhane, le produit brut est dissous dans l'acétate d'éthyle et la solution organique est lavée avec NaHCO₃ 5%, H₂O, KHSO₄ 1N et H₂O. Après séchage sur Na₂SO₄ et évaporation de la phase organique, le produit est

récupéré su forme d'huile avec un rendement de 94%. Le produit est caractérisé par spectroscopie RMN et FT-IR, et utilisé pour la réaction suivante sans purifications ultérieures.

d) H-Lys(Mtt)-OAll

Fmoc-Lys(Mtt)-OAll (240 mg, 0,36 mmol) est solubilisé dans 20% de DEA (diéthyle amine) dans du DCM (10 ml). La réaction, suivie par CCM, se déroule pendant 5 heures après avoir ajouté encore 3 ml de DEA. Après évaporation de la solution, le produit brut est solubilisé dans le diéthyle éther et extrait avec une solution de KHSO_4 1 N. La solution acide est basifiée avec NaHCO_3 solide et le produit ré-extrait avec de l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée avec H_2O , séchée sur N_2SO_4 et évaporée. Le produit est récupéré sous forme d'huile avec un rendement quantitatif, et utilisé pour la réaction suivante.

2) Amination réductrice sur support solide

La réaction d'amination réductrice est effectuée en phase solide sur une résine 2-(3,5-dimethoxy-4-formylphenoxy)éthyle polystyrène commerciale, sur une échelle de 62 μmol . $\text{HCl} \times \text{H-D-Ala-OAll}$ (10 équivalents) et NaBH_3CN (10 équivalents) sont solubilisés dans la DMF et ajoutés à la résine. La réaction, suivie par spectrophotométrie FT-IR, se déroule pendant 24 heures sous agitation.

3) Préparation du dipeptide linéaire, précurseur de L4 et L4bis

L'acide aminé Fmoc-Lys(Mtt)-OH (5 équivalents) est solubilisé dans 1 ml de dichlorométhane en présence du collidine (14 équivalents) et activé avec du triphosgène (1,65 équivalents) pendant 1 minute. La solution est ensuite ajoutée à la résine (62 μmol) et la réaction de couplage se déroule pendant 30 minutes. La résine est lavée de manière extensive au DCM, à la DMF et séchée à l'éther.

4) Préparation du tripeptide linéaire précurseur de L4 et L4bis

Le conjugué dipeptide-résine (62 μmol) est traité avec $\text{Pd}(\text{Ph}_3)_4$ (2 équivalents), solubilisé dans 2 ml d'une solution de DCM:AcOH (acide acétique):NMM (N-méthyle

morpholine) en rapport 1850:100:50 pendant 6 h sous argon. La réaction est suivie par spectrophotométrie FT-IR. Ensuite, à l'acide aminé H-Lys(Mtt)-OAll (5,8 équivalents), solubilisé dans 1,5 ml de DMF et 600 µl de DCM, sont ajoutés HATU [O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluranium hexafluorophosphate] (4 équivalents) HOAt (7-azabenzotriazol) (4 équivalents), CuCl₂ (0,5 équivalents) et collidine (9 équivalents). La solution est ajoutée à la résine (62 µmol) et la réaction de couplage se déroule pendant 2 heures. La résine est lavée de manière extensive à la DMF, au DCM, au méthanol, séchée à l'éther et contrôlée par spectrophotométrie FT-IR.

5) Préparation de l'hexapeptide cyclique L4 et L4bis

Après déprotection du groupement Fmoc avec 25 % de pipéridine dans la DMF (2 × 15 min), les acides aminés Fmoc-D-Ala-OH, Fmoc-Lys(Mtt)-OH et Fmoc-D-Ala-OH (5 équivalents) activés avec Bop (5 équivalents), HOBt (5 équivalents) et DIEA (15 équivalents) dans la DMF sont couplés pendant 1 heure (chaque couplage est répété 2 fois). Le groupement allyle est clivé avec Pd(Ph₃)₄ (2 équivalents), solubilisé dans 2 ml d'une solution de DCM:AcOH:NMM en rapport 1850:100:50 pendant 6 h sous argon. Le groupement Fmoc est clivé avec une solution 25% de pipéridine dans la DMF (2 × 15 min). Le dérivé hexapeptide-résine linéaire avec les extrémités N- et C-terminales libres est cyclisé en présence de HOAt (4 équivalents), DIC (diisopropylcarbodiimide) (4,4 équivalents) dans une solution de DMF/DCM 5:2 (2,1 ml) pendant 3 heures. Le groupement Mtt est clivé avec une solution (2 ml) de 85% DCM, 10% TIS, 5% TFA (3 × 2 min). Les acides aminés Fmoc-Ahx-OH (H-Ahx-OH : acide 6-amino hexanoïque), Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH et Fmoc-Lys(Boc)-OH (15 équivalents) activés avec Bop (15 équivalents), HOBt (15 équivalents) et DIEA (45 équivalents) dans la DMF sont couplés pendant 1 heure (chaque couplage est répété 2 fois). Le peptide cyclique est clivé de la résine avec une solution (3 ml) de 90% TFA, 5% H₂O, 5% TIS pendant 2 heures. Le clivage est répété une deuxième fois dans les mêmes conditions pendant 3 heures. Après précipitation dans de l'éther froid, on obtient à la fois le produit L4 et le sous-produit L4bis qui sont ensuite lyophilisés dans un mélange H₂O/acétonitrile/acide acétique (80/15/5). Les produits sont contrôlés par spectrométrie de masse (MALDI-MS) et HPLC analytique, purifiés et séparés par HPLC préparative sur colonne C₁₈ en utilisant un gradient d'acétonitrile dans l'eau.

E) PRÉPARATION DU COMPOSÉ L7

Le ligand L7 répond à la formule suivante :

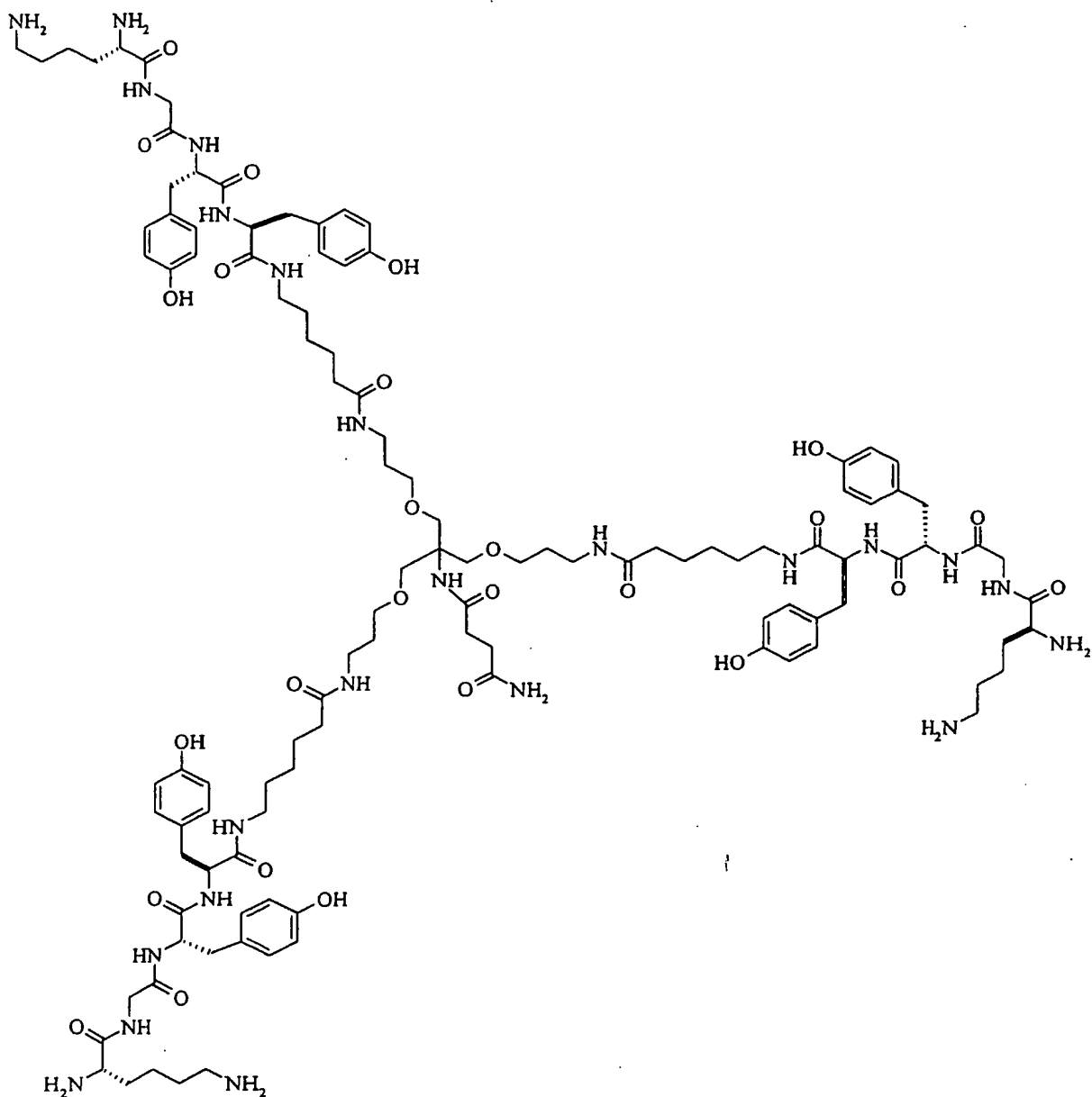
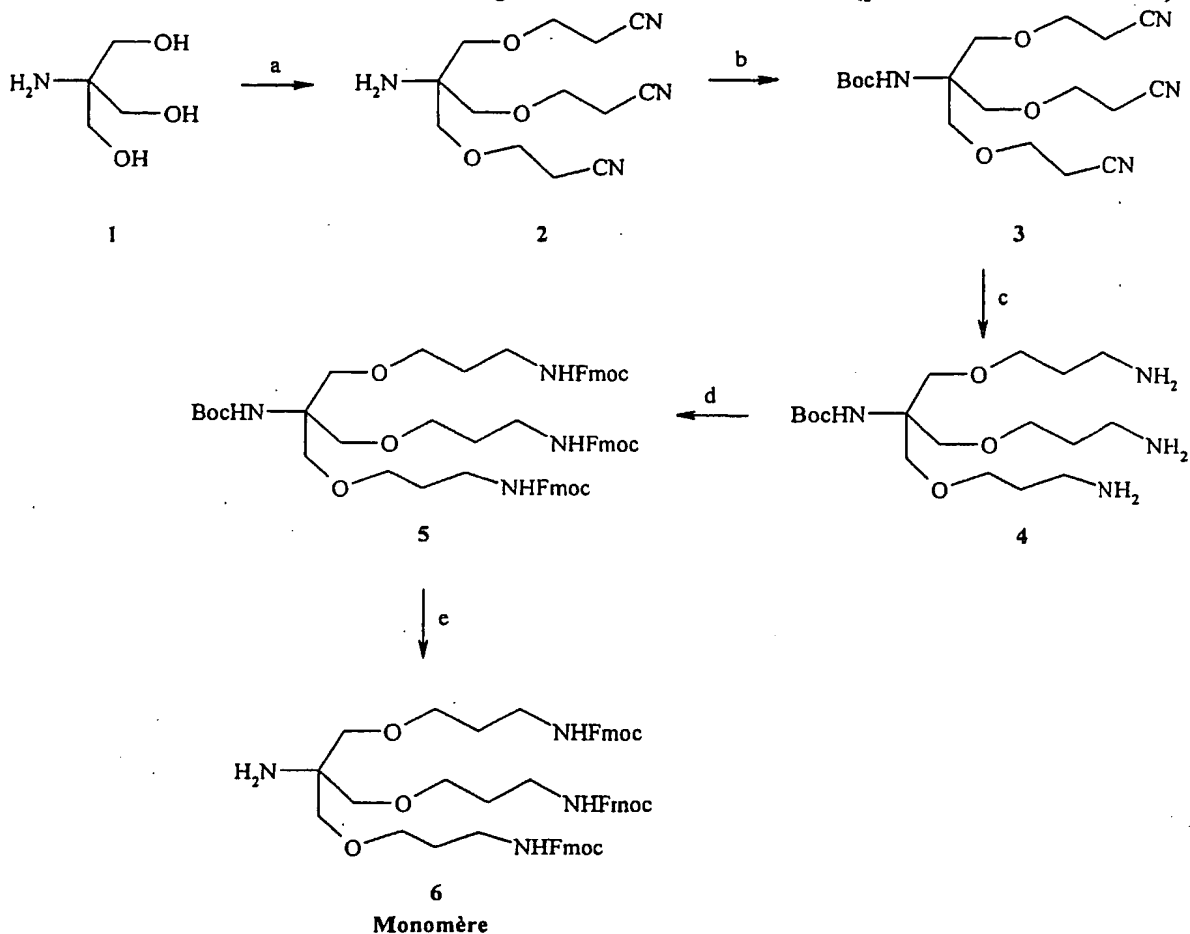


Schéma réactionnel : Préparation du monomère 6 (produit intermédiaire)



a. 2 g (1 éq.) de tris(hydroxyméthyl)aminométhane **1** ont été dissous dans du THF sous agitation et 40% de KOH aqueux a été ajouté, et ensuite 4,34 ml (4 éq.) d'acrylnitrile ont été ajoutés. Le mélange réactionnel a été maintenu à température ambiante sous agitation pendant 24 heures. Après évaporation d'une partie du THF, de l'eau a été ajoutée et ensuite extraite avec du dichlorométhane (DCM), séchée sur du sulfate de sodium. Après que le solvant ait été supprimé par évaporation, le produit brut **2** a été obtenu. Il a été ensuite purifié par chromatographie (EA/HEX/MeOH = 3,5/3,5/1). Masse : 2,5g ; Rendement : 54%.

b. 2 g (1 éq.) du composé **2** ont été dissous dans du THF sous agitation, et refroidis avec un bain de glace. 2,14 g (1,5 éq.) de (Boc)₂O ont été dissous dans du THF dans un autre flacon, qui ont ensuite été ajoutés lentement dans le milieu réactionnel, après avoir ajouté 2,3 ml (1,5 éq.) de DIEA au milieu réactionnel. L'ensemble a été conservé à température ambiante et sous agitation pendant la nuit. Après évaporation d'une partie du THF, on a ajouté de l'acétate d'éthyle et lavé séquentiellement avec

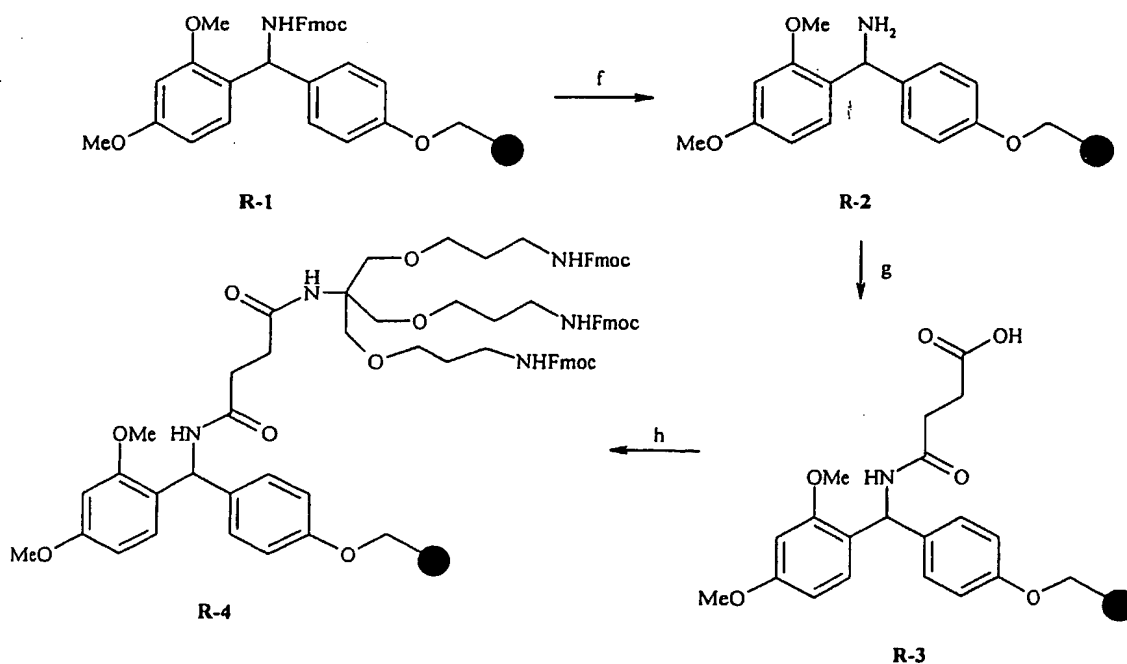
KHSO₄(1N) H₂O, NaHCO₃(st.) et NaCl (st.). Le produit 3 a ensuite été purifié par chromatographie (DCM/EA = 10/1). Poids : 2,39g ; Rendement : 71%.

c. Le composé 3 a été dissous dans MeOH/CHCl₃ (55/1). On a ajouté 10% de PtO₂ et ensuite le flacon a été balayé avec de l'hydrogène et maintenu sous atmosphère d'hydrogène pendant la nuit. Après filtration et évaporation du solvant, le composé 4 a été obtenu et séché sous vide.

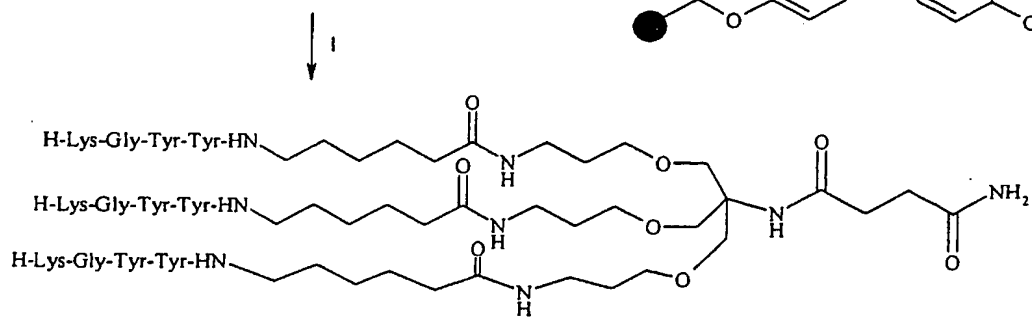
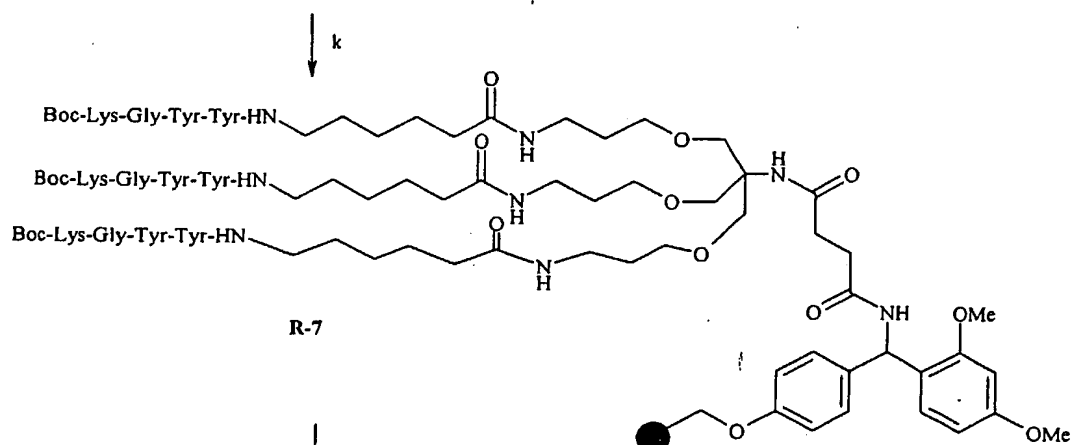
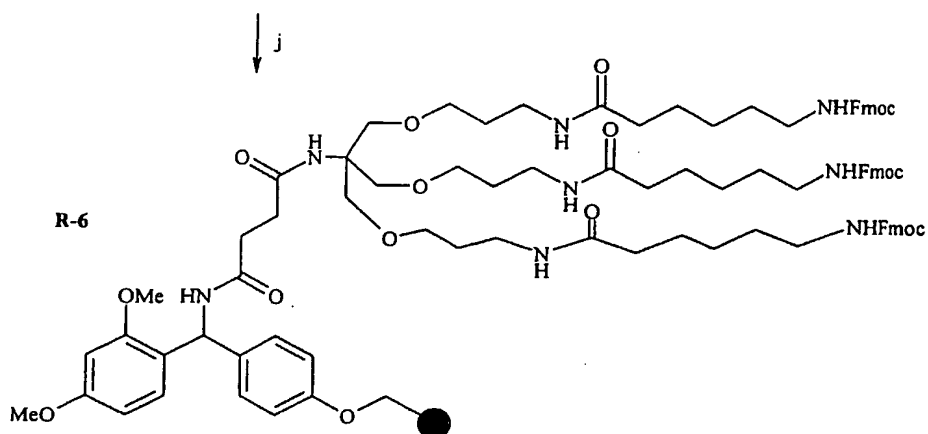
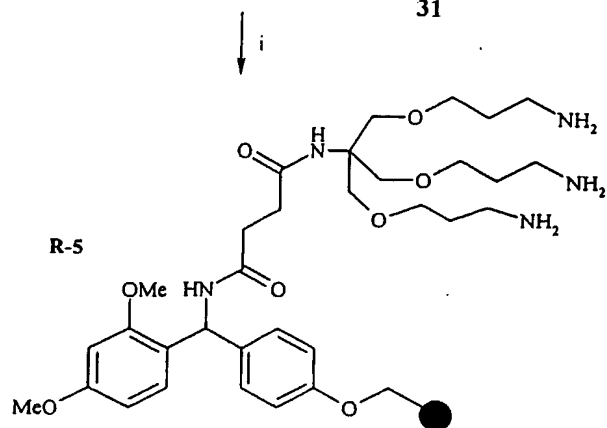
d. Le composé 4 a été dissous dans l'eau sous agitation. 6 éq. de NaHCO₃ ont été ajoutés sous forme de poudre. 3,6 éq. de FmocOSu ont été dissous dans du THF et ajoutés au mélange réactionnel. La réaction a duré 4 heures et ensuite le THF a été évaporé. Le mélange restant a été extrait avec du DCM, et ensuite la phase organique a été lavée avec une solution 1 N de KHSO₄. Après avoir été séché sur du sulfate de sodium, le solvant a été supprimé par évaporation. Le composé final a été purifié par chromatographie (acétate d'éthyle/Hexane/acide acétique = 3/7/0,5).

e. Le composé 5 a été dissous dans du TFA pur sous agitation pendant 30 minutes, et ensuite le TFA a été retiré par évaporation pour donner le composé 6 (monomère). Le rendement global des deux dernières étapes est 73,3%.

Les réactions sur résines ont été effectuées dans une seringue sous agitation.



31



f. La résine amide de Rink R-1 avec une charge de 0,62 mmol/g a été gonflée dans du diméthylformamide (DMF). Le groupe Fmoc a été retiré par 25% pipéridine/DMF. La réaction a été effectuée deux fois et chaque fois pendant 20 minutes.

g. La résine R-2 a été gonflée dans du DCM et 10 éq. d'acide succinique et 1 éq. de pyridine ont été ajoutés. La réaction a été poursuivie jusqu'à ce que le test à la ninhydrine soit négatif. La résine a été filtrée et lavée avec du DCM et du DMF.

h. La résine R-3 a été gonflée dans du DMF et ensuite 6 éq. de composé 6 (monomère 1), 5 éq. de BOP (benzotriazol-1-yloxy-tris(diméthylamino)phosphonium hexafluorophosphate), 5 éq. de HoBt (1-hydroxybenzotriazole) et 15 éq. de DIEA (diisopropyléthylamine) ont été ajoutés séquentiellement. Six heures plus tard, la résine a été filtrée et lavée avec du DMF, du DCM, de l'éther et séchée sous vide pour donner R-4. La charge est de 0,24 mmol/g après dosage UV quantitatif du groupement fluorényle, et la conversion globale est 84%.

i. Le groupe Fmoc a été retiré par 25% pipéridine/DMF pour donner R-5. La réaction a été effectuée deux fois et à chaque fois pendant 20 minutes.

j. La résine R-5 a été gonflée dans du DMF. 15 éq. d'acide Fmoc-6-aminocaproïque, 15 éq. de BOP, 15 éq. de HoBt et 60 éq. de DIEA ont été ajoutés et couplés pendant 4h pour donner R-6. La réaction a été vérifiée par le test à la ninhydrine.

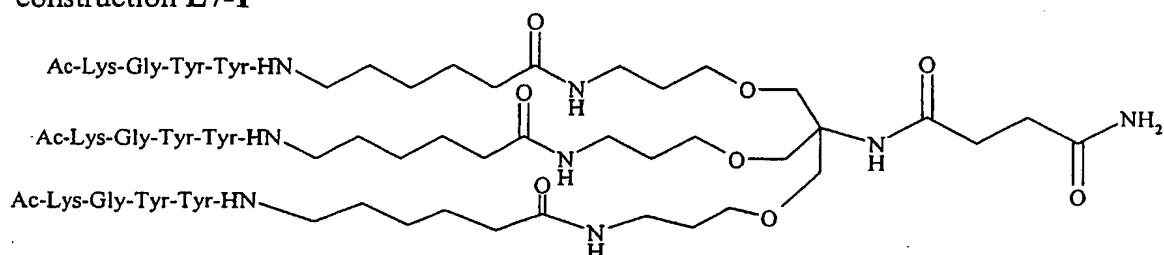
k. Le groupe Fmoc a été retiré par 25% pipéridine/DMF. 15 éq. de Fmoc-Xaa-OH, 15 éq. de BOP et 15 éq. de HoBt ont été dissous dans du DMF, et ensuite la solution a été ajoutée dans la résine, après avoir ajouté 60 éq. de DIEA. Pour chaque acide aminé, la réaction de couplage a été effectuée deux fois et à chaque fois pendant 30 minutes. Enfin, la résine R-7 a été vérifiée par le test à la ninhydrine.

l. Le peptide synthétisé a été clivé avec TFA/H₂O (95/5) pendant 30 minutes et ensuite la résine a été filtrée. La solution a été récupérée et précipitée dans de l'éther

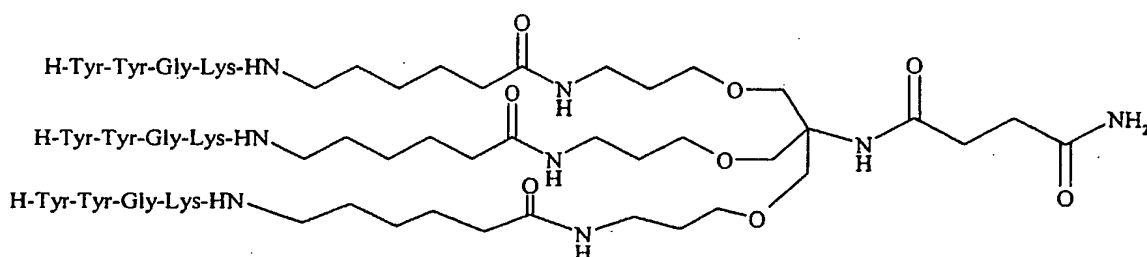
froid. Après avoir retiré l'éther, le peptide final L7 a été séché et purifié par CLHP et analysé par spectrométrie de masse.

Des analogues de L-7 ont été synthétisés en suivant le même schéma de synthèse mais en changeant la séquence peptidique pour l'interaction avec CD40 :

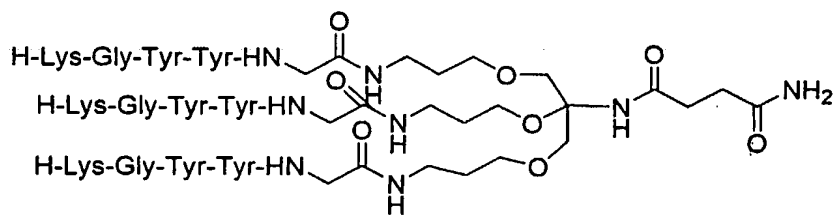
Il s'agit de la séquence acétylée : Ac-Lys-Gly-Tyr-Tyr- pour donner la construction L7-1



et de la séquence inversée : H-Tyr-Tyr-Gly-Lys- pour donner la construction L7-2



ou d'une modification du bras espaceur : remplacement de l'acide aminohexanoïque par une glycine : L7-3



L-7-3

F) PRÉPARATION DU COMPOSÉ L11

Le ligand L11 répond à la formule suivante :

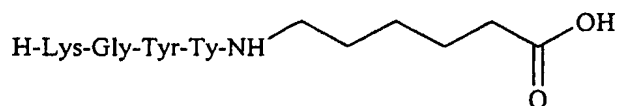
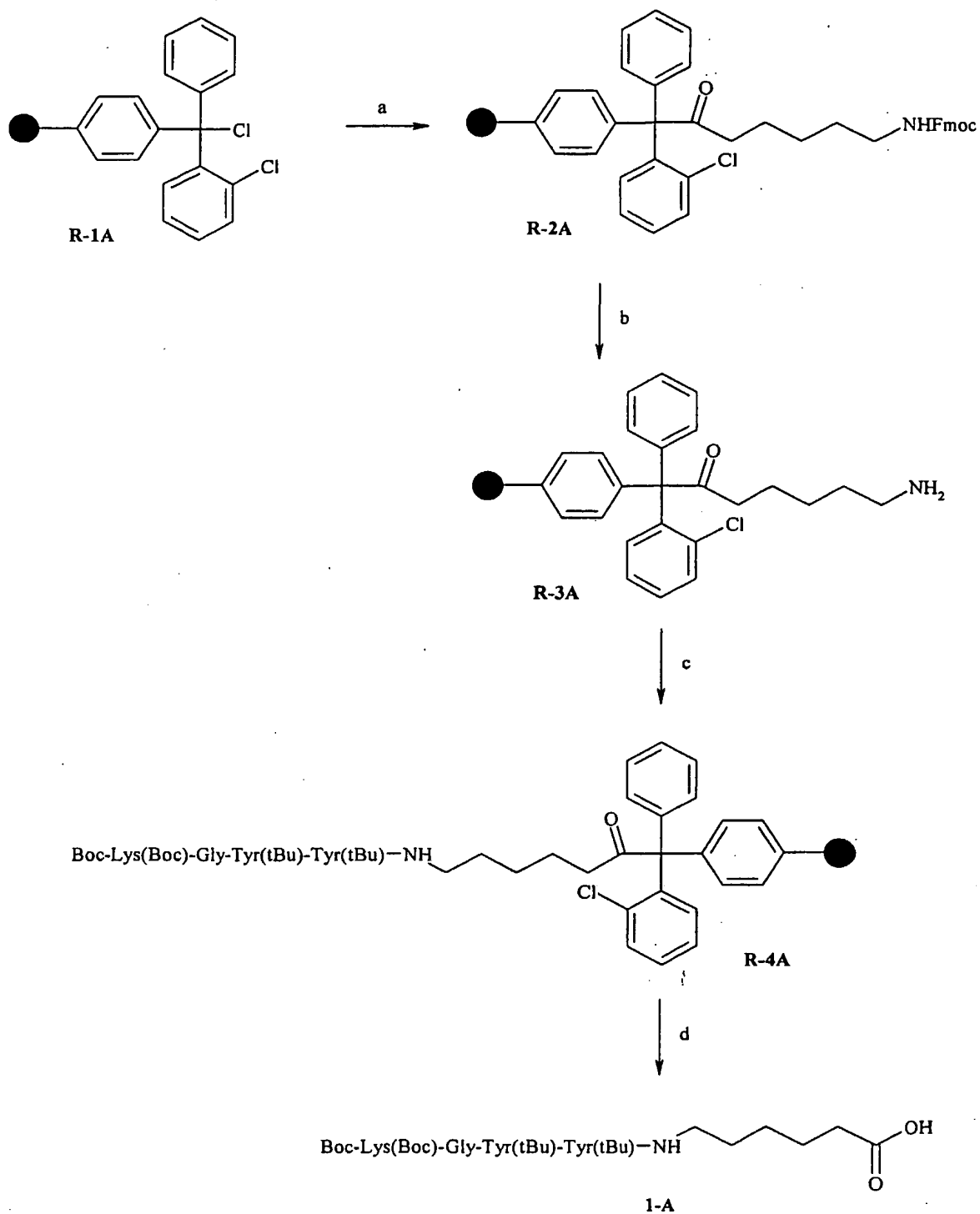


Schéma réactionnel :



a) acide Fmoc-6-aminocaproïque, DIEA, DCM; b) 25% pipéridine/DMF ;

c) Fmoc-Xaa-OH BOP, HoBt, DIEA, DMF ; d) 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol/
DCM (60/40)

1) Préparation du pentapeptide protégé : Boc-Lys(Boc)-Gly-Tyr(tBu)-Tyr(tBu)-Ahx-OH

Les réactions sur résine ont été effectuées dans une seringue et sous agitation.

1,5 g (1 éq.) de résine de 2-chlorotriptylchlorure (**R1-A**) (0,96 mmol/g) ont été lavés deux fois avec du DCM distillé dans une seringue sous agitation. Un mélange de 1,02 g (2 éq.) d'acide Fmoc-6-aminocaproïque et 1,5 ml (6 éq.) de DIEA dans du DCM a été préparé et ajouté à la résine. Trois heures après, la résine a été filtrée et lavée avec du DCM. Elle a été de nouveau gonflée dans du méthanol sous agitation pendant 1 heure. Elle est ensuite filtrée et lavée avec du DMF, IpOH (isopropanol), du DCM, de l'éther. Elle est ensuite séchée sous vide pour donner **R-2A**.

La résine **R-2A** a été traitée avec une solution de 25% pipéridine/DMF pendant 20 minutes et la résine a ensuite été filtrée pour donner **R-3A** et la solution a été récupérée. La réaction a été effectuée deux fois. La charge de la résine 2 était 0,6 mmol/g par dosage UV quantitatif de la solution récupérée et la conversion de la réaction de couplage est 81%.

Procédé général pour le couplage des acides aminés : 5 éq. de Fmoc-Xaa-OH, 5 éq. de BOP et 5 éq. de HoBt ont été dissous dans du DMF et ensuite le mélange a été ajouté à la résine qui a été prégonflée dans du DMF. 15 éq. de DIEA ont été ajoutés dans le système réactionnel. La réaction de couplage a été effectuée deux fois et à chaque fois pendant 30 minutes. La résine a été testée par le test à la ninhydrine.

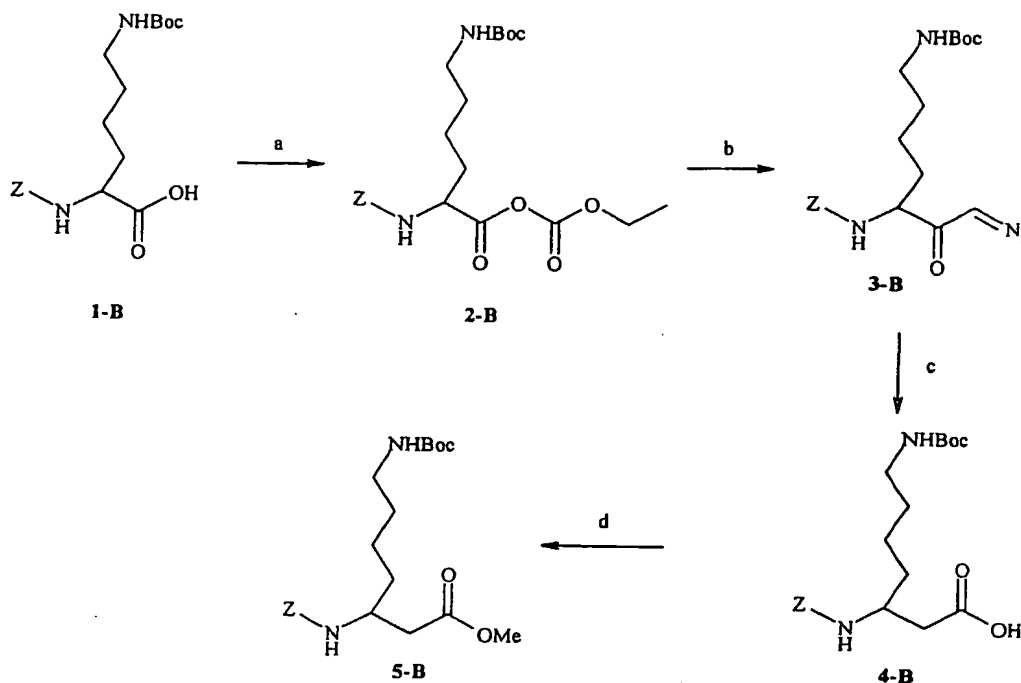
Après répétition de ces procédés de déprotection et de couplage en utilisant les acides aminés nécessaires à la synthèse du peptide, la résine **R-4A** a été obtenue.

La résine **R-4A** a été mise dans une seringue. Un mélange de 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol et de DCM (60/40) a été ajouté à la résine. La seringue a été maintenue sous agitation pendant 2 heures et ensuite la résine a été filtrée et la solution récupérée. Après évaporation du solvant, le produit restant a été précipité dans de l'éther froid et ensuite purifié par CLHP pour donner **1-A**.

2) Le peptide 1-A a été traité avec du TFA en présence d'eau, et de triisopropylsilane (95:5:5) pour donner L11 qui a été précipité dans de l'éther froid, centrifugé, lyophilisé et purifié par CLHP en phase inverse (RP-CLHP).

G) PRÉPARATION DU COMPOSÉ L9

1) Préparation de Z-beta-Lys(Boc)-OH (4B) et Z-beta-Lys(Boc)-OMe (5B)



a) EtOCOCI, NMM, THF ; b) CH₂N₂/Et₂O; c) CF₃COOAg, NMM, THF/10% H₂O
d) iodométhane, K₂CO₃, acétonitrile

a) On a dissous 40 mmol (1 éq.) de Z-Lys(Boc)OH dans 100 ml de THF sous agitation. On a ajouté 5,27 ml (1,2 éq.) de NMM, le mélange réactionnel a ensuite été refroidi à -20°C. On a dissous 4,59 ml (1,2 éq.) de chloroformate d'éthyle dans 30 ml de THF, et on a ensuite ajouté le tout goutte à goutte dans le système réactionnel. Le mélange réactionnel contenant 2-B a été maintenu au froid pendant 20 minutes de plus.

b) Préparation du diazométhane :

On a dissous 7,76 g de KOH dans un mélange de 12,5 ml d'eau, 10 ml d'éther et 35 ml de 2-(2-éthoxyéthoxy)éthanol sous agitation. On a chauffé à 75°C. 15,52 g de

diazald (N-méthyl-N-nitroso-p-toluènesulfonamide ; Aldrich) ont été dissous dans 140 ml d'éther et on a ajouté le tout goutte à goutte dans le mélange réactionnel. Le diazométhane ainsi produit a été condensé à -75°C dans un bain de glace dans de l'acétone. La solution étherée de diazométhane ainsi produite a été ajoutée dans la solution réactionnelle de **2-B** et, ensuite, le mélange réactionnel a été maintenu à température ambiante pendant la nuit. On a ajouté 1 ml d'éthylamine (EA) et ensuite une large quantité de NaHCO_3 (st.). Après séparation des phases organique et aqueuse, la phase organique a été lavée avec NaHCO_3 deux fois et avec NaCl (st) une fois. Après séchage sur du sulfate de sodium, le solvant a été évaporé et la diazocétone **3-B** ainsi produite a été séchée sous vide. Masse : 15,4 g ; Rendement : 95%.

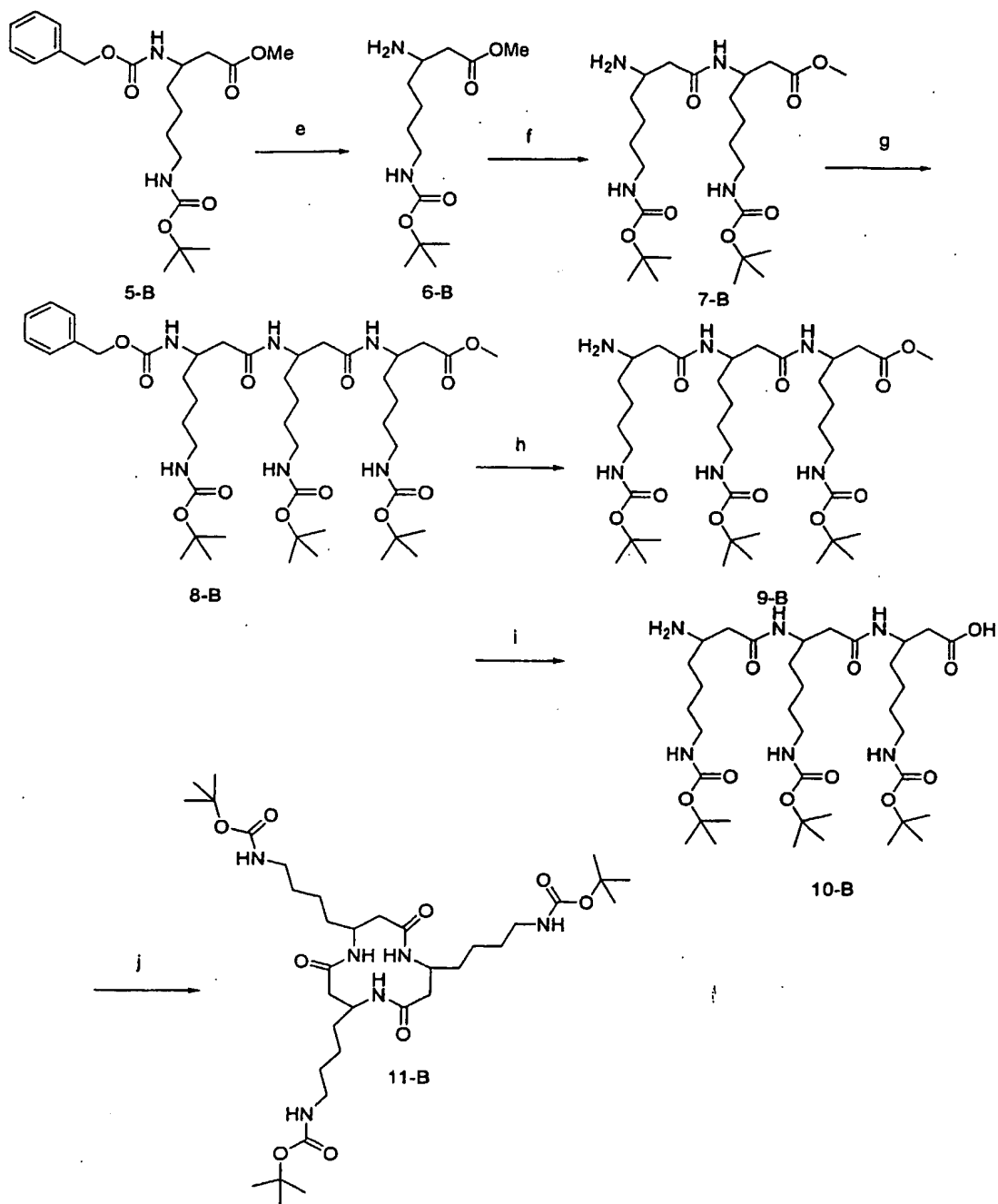
c) Réaction de réarrangement :

7 g (1 éq.) de la diazocétone **3-B** ont été dissous dans un mélange de 110 ml de THF et 18 ml d'eau sous agitation à l'abri de la lumière et l'ensemble a été refroidi à -20°C . 435 mg (0,11 éq.) de benzoate d'argent et 6,07 ml (2,5 éq.) de triéthylamine ont été ajoutés. Le mélange réactionnel a été maintenu à température ambiante pendant la nuit dans l'obscurité. Une partie du THF a été évaporée, on a ajouté 20 ml d'éther qui a été extrait avec NaHCO_3 plusieurs fois. La phase aqueuse a été combinée et acidifiée à pH 3 avec de la poudre de KHSO_4 . La solution a été extraite avec du DCM et séchée sur du sulfate de sodium. Après évaporation du solvant, le produit final **4-B** a été séché sous vide. Masse : 5 g ; Rendement : 73 %.

d) On a dissous 1,67 g (1 éq.) d'acide aminé β **4-B** tel qu'obtenu précédemment dans de l'acétonitrile et on a refroidi l'ensemble à 0°C avec un bain de glace. Au bout d'une heure, on a ajouté 1,32 ml (5 éq.) d'iodométhane. Le mélange réactionnel a été maintenu à température ambiante pendant la nuit. L'acétonitrile a été évaporé et on a ajouté de l'acétate d'éthyle, qui a été lavé séquentiellement avec NaHCO_3 (st.), KHSO_4 (1N) et NaCl (st.). La phase organique a été séchée sur du sulfate de sodium et le solvant a été supprimé par évaporation pour donner **5-B**. Masse : 1,53g ; Rendement : 88%.

2) Construction de la molécule cœur protégée :

Schéma réactionnel :



e) On a dissous 765 mg (1 éq.) de composé **5-B** dans de l'éthanol sous agitation et on a ajouté 10% de Pd/C (en poids). Le flacon a été balayé avec de l'hydrogène trois fois et maintenu sous une atmosphère d'hydrogène pendant 2 heures. Après filtration, le solvant a été supprimé par évaporation et le produit **6-B** restant a été séché sous vide. Masse : 400 mg ; Rendement : 98%.

f) On a dissous 657 mg (1 éq.) de composé **4-B** dans 3 ml de DMF sous agitation et ensuite on a ajouté séquentiellement 40 mg (1,1 éq.) de composé **6-B**, 738 mg (1 éq.) de BOP et 726 μ l (2,5 éq.) de DIEA. Deux heures après, le mélange réactionnel a été précipité dans $\text{NaHCO}_3(\text{st})$. Après filtration, le solide a été lavé avec H_2O , KHSO_4 , $\text{NaCl}(\text{st})$ et ensuite séché sous vide. Masse : 1 g ; Rendement : 84%. Ce composé a été hydrogéné dans MeOH pour donner **7-B** dans un rendement quantitatif.

g) On a dissous 1 équivalent de composé **4-B** dans 3 ml de DMF sous agitation et ensuite on a ajouté séquentiellement 1,1 éq. de composé **7-B**, 1 éq. de BOP, 2,5 éq. de DIEA. Au bout de deux heures, le mélange réactionnel a été précipité dans $\text{NaHCO}_3(\text{st})$. Après filtration, le solide a été lavé avec H_2O , KHSO_4 , $\text{NaCl}(\text{st})$ et ensuite séché sous vide pour donner **8-B**.

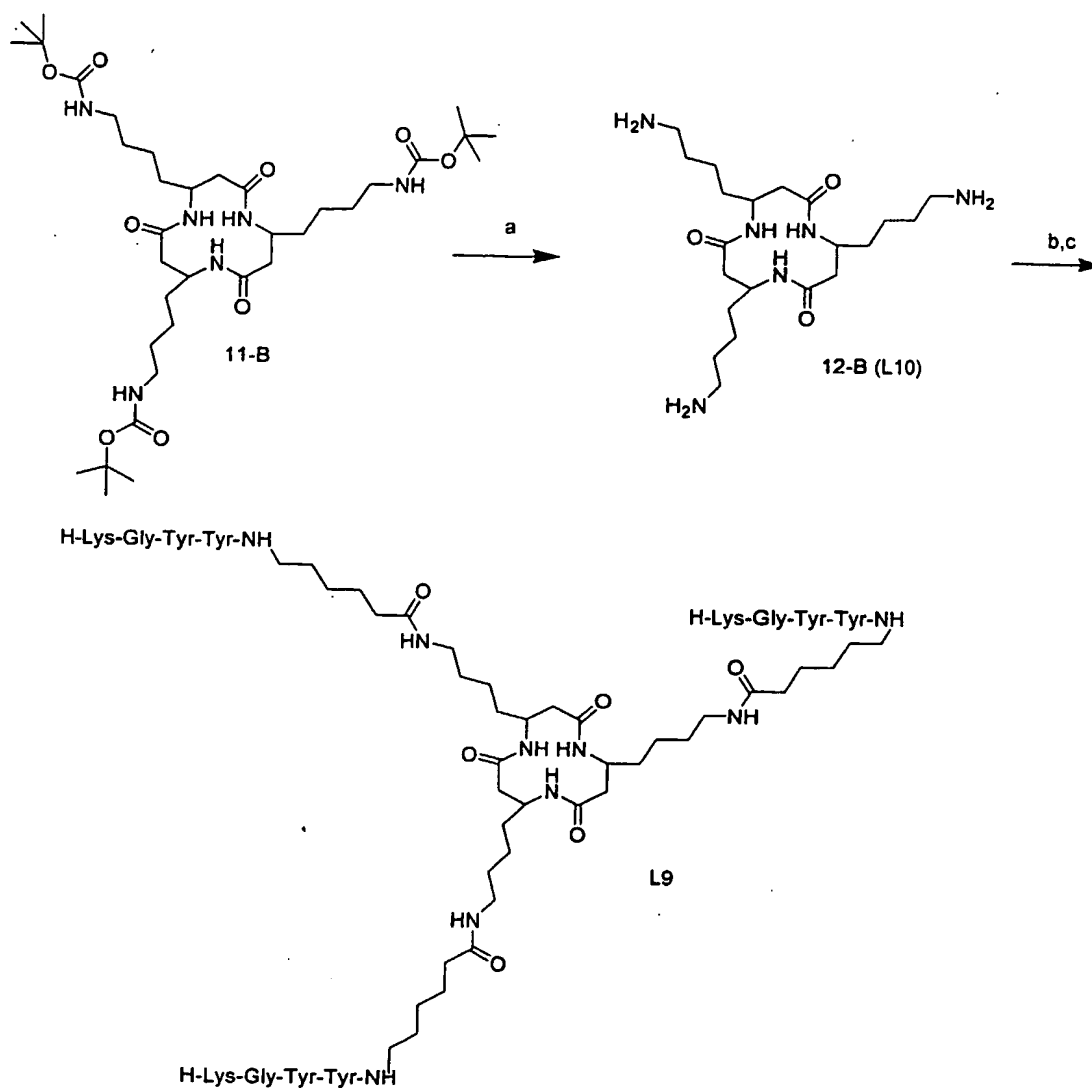
h) On a dissous 100 mg de composé **8-B** dans du méthanol sous agitation et on a ajouté 10% de Pd/C (en poids). Le flacon a été balayé avec de l'hydrogène trois fois et maintenu sous une atmosphère d'hydrogène pendant 2 heures. Après filtration, le solvant a été retiré par évaporation et le produit restant a été séché sous vide pour donner **9-B**. Masse : 78 mg ; Rendement : 92%.

i) On a dissous 78 mg (1 éq.) de composé **9-B** dans du méthanol et on a ensuite ajouté 10 éq. de NaOH aqueuse 2N. La réaction a été contrôlée par chromatographie sur couche mince CCM (solvants : acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau). A la fin de la réaction, le méthanol a été évaporé et on a ajouté de l'eau. Le mélange a été acidifié avec de l'acide acétique à pH 3 et un précipité s'est formé. Le solide a été récupéré par filtration et séché sous vide pour donner **10-B**. Masse : 50 mg ; Rendement : 65%.

j) On a dissous 50 mg (1 éq.) de composé **10-B** dans 3 ml de DMF et 42 μ l (3,5 éq.) de DIEA ont été ajoutés. 36 mg (1,2 éq.) de BOP ont été dissous dans 3 ml de DMF sous agitation. La solution préparée précédemment a été ajoutée goutte à goutte. Le mélange réactionnel a été maintenu à température ambiante pendant 2 jours et ensuite précipité dans $\text{NaHCO}_3(\text{st})$. Le précipité a été récupéré et lavé avec $\text{H}_2\text{O}/\text{KHSO}_4$ et H_2O , puis séché sous vide pour donner **11-B**. Masse : 37 mg ; Rendement : 76%.

3) Déprotection de la molécule cœur et synthèse de L-9

Schéma réactionnel :



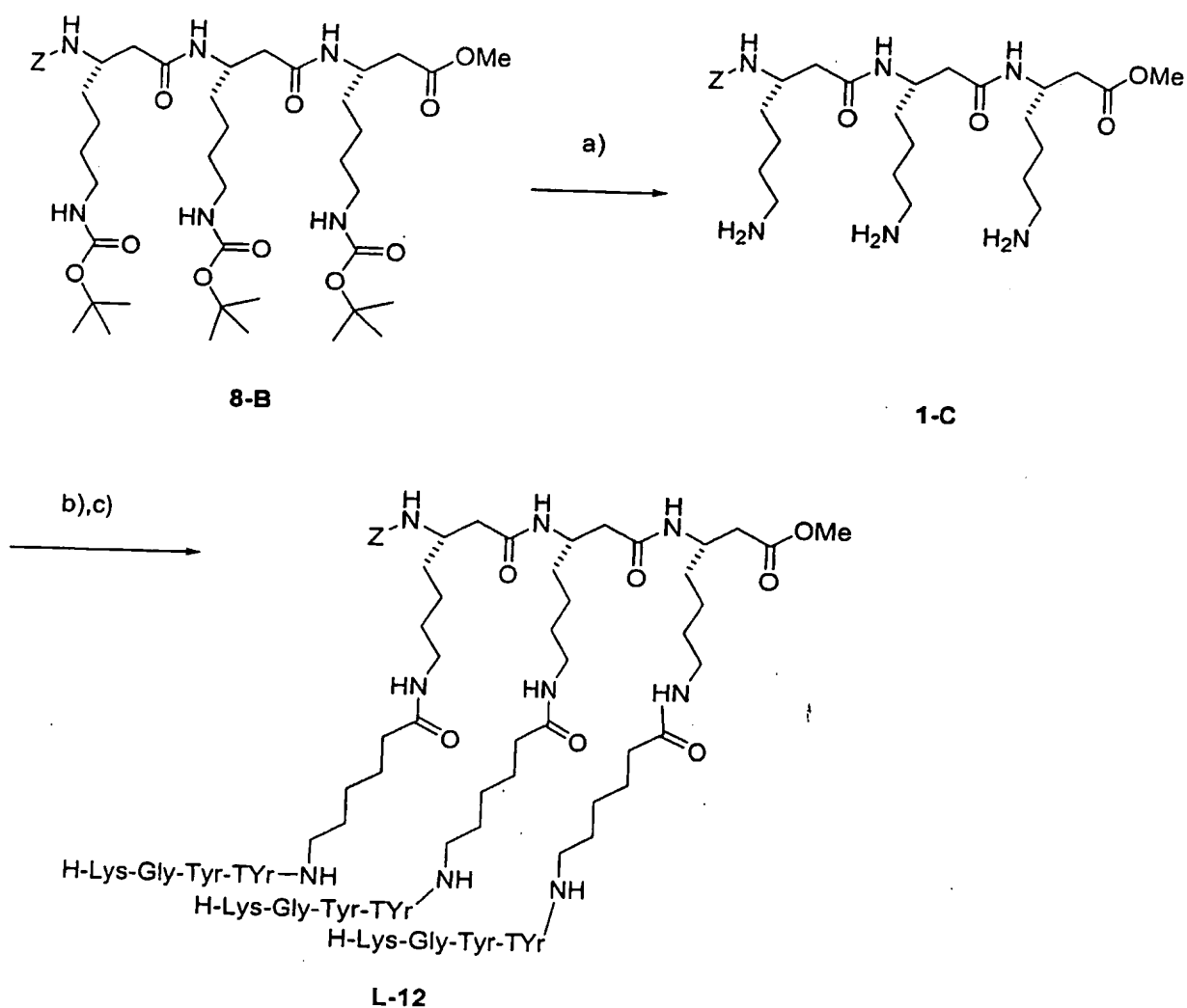
a) 50 mg (1 éq.) de composé 11-B ont été dissous dans du TFA sous agitation pendant 30 minutes et ensuite le TFA a été retiré par évaporation. Le produit a été séché sous vide pour donner 12-B (également nommé L10).

b) Le composé 12-B a été dissous dans du DMF sous agitation. 217 mg (3,3 éq.) du pentapeptide 1-A qui est synthétisé en phase solide comme décrit ci-dessus, 100 mg (3,3 éq.) de BOP, 39,5 μ l (10 éq.) de DIEA ont été ajoutés dans le système réactionnel. La réaction a duré pendant 25 heures et ensuite le mélange réactionnel a été précipité

dans une grande quantité de $\text{NaHCO}_3(\text{aq.})$. Le précipité a été filtré et lavé avec $\text{H}_2\text{O}/\text{KHSO}_4$, H_2O et de l'éthylamine (EA). Le solide a été séché sous vide pour donner 13-B. Masse : 153 mg ; Rendement : 69%.

c) Le traitement de 13-B avec du TFA a donné le composé du titre dans un rendement quantitatif. Le composé L9 pur a été obtenu par purification par RP-CLHP (chromatographie en phase inverse).

H) PRÉPARATION DE L12 :



a) On a dissous 1 équivalent de composé **8-B** dans du TFA sous agitation pendant 30 minutes et ensuite le TFA a été retiré par évaporation. Le produit a été séché sous vide pour donner **1-C**.

b) Le composé **1C** a été dissous dans du DMF sous agitation. 3,3 éq. du pentapeptide **1-A** qui est synthétisé en phase solide comme décrit ci-dessus, 3,3 éq. de BOP et 10 éq. de DIEA ont été ajoutés dans le système réactionnel. La réaction a duré 25 heures et ensuite le mélange réactionnel a été précipité dans une grande quantité de $\text{NaHCO}_3(\text{aq.})$. Le précipité a été filtré et lavé avec $\text{H}_2\text{O}/\text{KHSO}_4$, H_2O et de l'éthylamine. Le solide a été séché sous vide pour donner **2-C**. Masse : 153 mg ; Rendement : 69%.

c) Le traitement de **2-C** avec du TFA a donné le composé **L-12** dans un rendement quantitatif. Le composé **L-12** pur a été obtenu par purification par chromatographie RP-HPLC.

TESTS BIOLOGIQUES :

Ces tests s'effectuent en 3 phases. On choisit d'abord les ligands les plus intéressants par des tests simples, puis leurs effets physiologiques sont testés dans des modèles d'activations cellulaires *in vitro*. Enfin, les ligands les plus intéressants sont testés dans des modèles murins *in vivo*.

I – SÉLECTION DES LIGANDS :

Une fois l'intégrité structurale de ces ligands analysée, leur liaison est testée sur des molécules CD40 solubles ou membranaires. Pour cela, on mesure l'inhibition de la liaison du CD40L soluble sur la molécule CD40 adsorbée à du plastique ou présentée par des cellules B normales ou transformées (lymphome de Burkitt). Cette étape est évaluée à l'aide d'un test ELISA et d'un marquage en cytométrie de flux permettant de visualiser la liaison CD40/CD40L.

Ensuite, l'affinité de ces ligands pour la molécule CD40 est évaluée à l'aide d'un biocapteur (BIAcore™). L'effet agoniste ou antagoniste des ligands a été testé grâce à deux tests biologiques simples. Dans le premier, on étudie l'expression de la molécule membranaire CD95 par des cellules B transformées (lymphomes de Burkitt) après activation par l'interaction CD40-CD40L (Schattner et al., 1996). Dans un tel modèle, le partenaire CD40L est exprimé sur des fibroblastes transfectés (3T6-CD40L) (Buelens et al., 1997). Les cellules du lymphome de Burkitt BL41 sont incubées avec des fibroblastes 3T6 non transfectés (Figures 3A et 3C) ou avec des fibroblastes 3T6 transfectés par CD40L (Figures 3B et 3D). Après 48h, l'expression de CD95 est évaluée par cytométrie de flux. L'expression de CD95 est induite en présence de CD40L (Figure 3B). Un anticorps anti-CD40L commercial inhibe les conséquences de l'interaction CD40-CD40L (Figure 3D).

Le second test est basé sur la propriété de certains lymphomes B de cesser de proliférer et d'entrer en apoptose lors du pontage de leur molécule CD40 membranaire (Tong et al., 1999). Dans ce test, on incube les cellules BL41 avec des ligands de CD40 et on mesure après 24h soit l'inhibition de prolifération de ces cellules, en étudiant l'incorporation de thymidine tritiée, soit le pourcentage de cellules apoptotiques par une étude en cytométrie de flux (Figures 4A et 4B).

L'effet agoniste des ligands est évalué par la mesure après incubation des cellules B avec les ligands soit de l'expression de CD95 en cytométrie de flux soit de l'inhibition de la prolifération et/ou de l'augmentation de la mort par apoptose.

L'effet antagoniste est évalué par la mesure de la diminution de l'expression de CD95 induite par le CD40L en présence des différents ligands chimiques (voir Tableau I). Grâce à ces tests, on sélectionne les ligands les plus intéressants pour évaluer leur activité *in vivo* et *in vitro* dans des modèles plus complexes.

A) PRINCIPE DES TESTS BIOLOGIQUES

1- Expression de CD95 induite par CD40L

Les cellules de lymphomes B expriment la molécule CD95 lorsqu'elles reçoivent un signal par l'intermédiaire de la molécule CD40, qu'elles expriment de manière constitutive. Ce signal est généralement apporté par la molécule CD40L (CD154) exprimée par une autre cellule. Les ligands antagonistes inhibent la liaison de CD40 sur CD40L et bloquent donc l'expression de CD95. Les ligands agonistes miment la molécule CD40L et induisent l'expression de CD95 même en absence de la cellule exprimant CD40L.

Mode opératoire

Les cellules du lymphome de Burkitt BL41 ($5 \cdot 10^5$ /ml) sont cultivées en présence de fibroblastes 3T6 (10^5 /ml) transfectés (3T6-CD40L) ou non avec CD40L (3T6), et traitées à la mitomycine pour arrêter leur prolifération. Les ligands sont ajoutés au début de la culture à la concentration désirée. Après 48h de culture, l'expression de la molécule CD95 est mesurée en cytométrie de flux. Les cellules BL41 sont distinguées des fibroblastes en utilisant un anticorps anti-CD19 (marqueur spécifique des cellules B).

Résultats

Les cellules BL41 cultivées en présence des cellules 3T6 n'expriment pas la molécule CD95 (Figure 3A). Par contre, l'expression de CD95 est induite à la surface des cellules BL41 en présence de cellules 3T6-CD40L (Figure 3B). Un anticorps anti-CD40L commercial, qui bloque l'interaction CD40/CD40L, inhibe complètement

l'expression de CD95 induite sur les cellules BL41 en présence des cellules 3T6-CD40L (Figure 3D).

L'expression de CD95 est inhibée par le ligand L1 à 100 et 50 μ M (Tableau 1). Le ligand L3, qui a la même structure cœur que L1, mais qui présente une séquence en acides aminés différente inhibe fortement l'expression de CD95 induite par CD40L de 100 à 25 μ M. Le ligand L2, qui correspond à la structure cœur des ligands L1 et L3, n'a aucun effet sur l'expression de CD95. Le ligand L7, constitué d'une structure cœur branchée portant la même séquence peptidique que L3, n'a aucun effet sur l'expression de CD95 induite par CD40L. Par contre, le ligand L4, à structure cœur cyclique portant 3 exemplaires de la séquence peptidique mimant l'interface CD40-CD40L, inhibe l'expression de CD95 induite par CD40L pour une gamme de concentrations allant de 50 à 0,5 μ M. Son activité est donc environ 10 fois plus importante que le ligand linéaire qui présente le même peptide (L3). Il est intéressant de noter que l'inhibition maximale est obtenue pour une concentration de 10 μ M, la concentration de 50 μ M induisant une mortalité cellulaire importante (cf. partie 2). Le ligand L4 bis qui est constitué de la même molécule cœur mais qui ne porte que 2 exemplaires de la séquence peptidique mimant l'interface CD40-CD40L n'inhibe que très faiblement l'expression de CD95 induite par CD40L.

Tableau I
% d'inhibition de l'expression de CD95 induite par CD40L
après traitement avec

	L1	L2	L3	L4	L4bis	L7
100 μ M	60	0	60			
50 μ M	43	0	62	22	13	0
25 μ M	0	0	25			
10 μ M			13	40		
5 μ M			0	36	8	0
0,5 μ M				19	0	0

2- Induction de l'apoptose des lymphomes B par CD40L

Certains lymphomes B entrent en apoptose lors du pontage de leur molécule CD40 par un anticorps anti-CD40 ou par du CD40L soluble de manière indépendante de la molécule CD95. Cette induction d'apoptose se traduit par une diminution de prolifération

mesurée par l'incorporation de thymidine tritiée. Les ligands agonistes de CD40 vont induire une augmentation de l'apoptose et par conséquent une diminution de l'incorporation de thymidine tritiée.

Mode opératoire

Les cellules du lymphome de Burkitt BL41 ($4.10^5/\text{mL}$) sont cultivées en présence des différents ligands à la concentration désirée. Après 24h, les cellules sont soit incubées pendant 8h avec de la thymidine tritiée ($1\mu\text{Ci/puits}$) pour mesurer la prolifération soit marquées avec de l'Annexine V FITC et de l'iodure de propidium pour évaluer le pourcentage de cellules apoptotiques en cytométrie de Flux.

Résultats

Le ligand L4 (cœur à structure cyclique + 3 exemplaires de la séquence peptidique mimant l'interface CD40-CD40L) tout comme la molécule CD40L soluble inhibe très fortement la prolifération des cellules BL41. Par contre le ligand L7 (cœur à structure branchée portant la même séquence peptidique que L4) et ses dérivés L7-1, L7-2 et L7-3 n'ont que peu ou pas d'effet sur la prolifération des cellules BL41 (Figure 4A).

Cette inhibition de prolifération s'accompagne pour le ligand L4 d'une forte augmentation de l'apoptose alors que le ligand L4bis (structure cœur cyclique + 2 exemplaires de la séquence peptidique) induit une très faible apoptose. Le ligand L8 constitué de la structure cœur seule ou le ligand L11 constitué de la séquence peptidique seule n'ont aucun effet sur la mort par apoptose des cellules BL41 (Figure 4B).

Le ligand L9 qui est constitué d'une structure cœur cyclique différente de celle du ligand L4 portant 3 exemplaires de la même séquence peptidique induit aussi fortement l'apoptose de BL41 (Figure 4B).

En conclusion, les ligands L4 et L9 ont une activité agoniste et miment CD40L.

B) ÉTUDE DE L'INTERACTION ENTRE LE CD40 ET LE CD40L ET LES LIGANDS L1 à L12 :

Principe de la méthode

Le Biacore3000 est un appareil qui permet l'étude des interactions entre deux molécules, basé sur la résonance plasmonique de surface. Il permet de mesurer en temps réel, et donc de suivre les cinétiques d'interaction (association et dissociation) d'un

analyte (qui se trouve dans une solution injectée) et d'un ligand (immobilisé sur une micropuce supportant la mesure). Les mesures cinétiques à différentes concentrations d'analyte permettent de calculer les constantes d'affinités de l'interaction entre le ligand et les analytes. La micropuce contient quatre cellules de mesure différentes, ce qui permet de comparer directement une cellule de référence sur laquelle une protéine non-pertinente (protéine qui n'a aucune affinité avec le ligand étudié), mais proche du ligand est immobilisée avec la cellule sur laquelle le ligand est immobilisé.

Mode opératoire

Sur une micropuce ont été immobilisés des anticorps de lapin dirigés contre la partie constante d'immunoglobulines de souris. Dans la cellule de référence on immobilise avec un flux de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ durant 2 minutes un anticorps monoclonal de souris d'isotype IgG2a (LG112) à 40 nM ; dans la cellule du ligand on immobilise dans les mêmes conditions le CD40 recombinant associé à la partie constante de la chaîne lourde d'IgG2a de souris (human CD40 muIg fusion protein, ANCELL Corporation, Bayport, MN).

Sur les deux cellules (référence et ligand) sont ensuite injectés, comme analyte, le CD40L (human CD154 muCD8 fusion protein, ANCELL Corporation) à différentes concentrations ou le CD40L à une concentration de 1 μM ou de 125 nM, en présence de différents concentrations de ligands. Le flux en présence des analytes est de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ pendant 5 minutes pour étudier l'association et, en absence d'analytes, les conditions sont les mêmes pour étudier la dissociation.

Afin de régénérer les cellules (c'est-à-dire enlever toutes les protéines adsorbées de manière non covalente), une solution de 10 mM de HCl est injectée à 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ durant 1 minute. Les cellules sont ensuite prêtes pour une nouvelle analyse.

Résultats

Afin d'étudier la constante d'affinité du CD40L pour le CD40, on utilise 4 concentrations de CD40L de 62,5 jusqu'à 500 nM. La constante d'équilibre est calculée à 54 nM.

Pour étudier l'association avec L1, l'analyte était constitué de CD40L à 1 μM et de L1 à 50 μM . Bien qu'une inhibition soit observée durant les premières secondes de l'interaction, elle disparaît au cours des cinq minutes d'association, rendant impossible le calcul de la constante d'équilibre de L1. Celle-ci est donc plus grande que 50 μM .

L'association de L3 fut étudiée en présence de 125 nM de CD40L. L'analyse cinétique en présence de 2,5 μ M de L3 a donné une constante d'équilibre pour L3 de 10 μ M.

L'association de L4, de L7 (et de ses dérivés), de L8, de L9 de L11 et de L12 a été étudiée en présence de 100nM de CD40L. Seules les molécules L4 et L9 se fixent sur CD40 et déplacent CD40L. L'analyse cinétique en présence de 40 et 80nM de L4 donnait une constante d'équilibre pour L4 de 180nM. Le ligand L4 inhibait 50% de la fixation de CD40L (IC50) à 80 nM. Le ligand L9, testé dans les mêmes conditions, a une IC50 qui est inférieure à 50nM, sa constante d'équilibre est donc inférieure à celle de L4. Il est intéressant de remarquer que la molécule qui est une version linéaire de L9 ne se fixe pas à CD40. Ces résultats suggèrent que la conception de ligand actifs de CD40 nécessite l'utilisation d'une molécule cœur (A dans la formule générale : A-X_n) suffisamment rigide et de symétrie C3.

II - TESTS DES LIGANDS DANS DES MODÈLES *IN VITRO* :

Les cellules dendritiques immatures, différenciées *in vitro* à partir de monocytes humains, sont très sensibles au CD40L qui induit leur maturation. Cette maturation s'accompagne (i) de profonds remaniements phénotypiques, (ii) d'une sécrétion de cytokines et de chimiokines, (iii) d'une résistance à l'apoptose médiée par le CD95 (Koppi et al., 1997 ; Bjorck et al., 1997), (iv) d'une longévité accrue des cellules dendritiques (Miga et al., 1997) et (v) d'une capacité nettement accrue des cellules dendritiques matures à stimuler des lymphocytes T allogéniques. On étudie l'effet de ces ligands sur les CDs. On étudie en premier lieu, par cytométrie en flux, la capacité des ligands agonistes potentiels à modifier le phénotype des CDs immatures. On poursuit cette étude en cherchant à mettre en évidence, à l'aide de tests ELISA, le déclenchement par les ligands agonistes d'une sécrétion de cytokines. Enfin, cette recherche est complétée par l'étude de la capacité des CDs, préincubées en présence des molécules agonistes, à stimuler des cellules T allogéniques. L'effet des ligands antagonistes est évalué par la mesure de la diminution des variations, normalement induites par le CD40L, observée en préincubant les CDs en présence des molécules antagonistes. L'effet des ligands peut aussi être testé (i) sur la commutation de classes des lymphocytes B, qui peut être mimée *in vitro* par activation de cellules B des

amygdales par CD40 en présence de cytokines, et (ii) sur la différenciation des lymphocytes T cytotoxiques qui peut être mimée par une co-incubation de cellules dendritiques activées par CD40 et des cellules T pré-cytotoxiques.

III - TESTS DES LIGANDS DANS DES MODÈLES *IN VIVO* :

Les ligands L4 et L9 s'étant révélés agonistes, ils représentent des touches intéressantes pour tester l'effet thérapeutique de nos molécules. Le lupus érythémateux disséminé est une maladie auto-immune systémique dans laquelle l'importance de l'interaction CD40-CD40L est bien documentée. Le traitement de souris lupiques par des anticorps anti-CD40 agonistes accélère fortement la maladie lupique. Pour tester l'effet *in vivo* des différents ligands, nous les avons injectés à des souris qui développent spontanément une maladie lupique présentant des symptômes proches du lupus érythémateux disséminé humain. Nous avons étudié l'effet des ligands sur le développement de la maladie.

Mode opératoire

Des souris MRL-^{lpr} (Koopman et al., 1988) pré-autoimmunes (âgées de 5 semaines) sont injectées par voie intraveineuse avec 100 µL par souris de PBS contenant ou non 100 µg de ligand L4. L'injection est répétée 2 fois à 2 semaines d'intervalle. Le sérum de ces souris est prélevé régulièrement par saignée rétro-orbitale. Le développement de la maladie lupique est suivi par une mesure de la protéinurie dans les urines, de la présence d'anticorps anti-ADN dans le sérum par un test ELISA et de la survie des souris. Ces deux marqueurs sont caractéristiques du développement de la maladie lupique chez les souris MRL-^{lpr}.

Résultats

Les souris traitées par le ligand L4 meurent significativement ($p=0,0101$) plus vite que les souris traitées par du PBS (Figure 5A). Cette accélération de la mortalité s'accompagne d'une apparition plus précoce des anti-ADN dans le sérum (Figure 5B) et de la protéinurie dans les urines (Figure 5C), montrant que la mortalité est sans doute due à une accélération de la maladie lupique. Ces résultats montrent clairement que le ligand L4 a un effet agoniste *in vivo*.

RÉFÉRENCES

- Bjorck, P., Banchereau, J., Flores-Romo, L. (1997) CD40 ligation counteracts Fas-induced apoptosis of human dendritic cells, *Int Immunol.*, **9**: 365-72,
- Buelens, C., Verhasselt, V., De Groote, D., Goldman, M., Willems, F. (1997) Human dendritic cell responses to lipopolysaccharide and CD40 ligation are differentially regulated by interleukin-10, *Eur J Immunol.*, **27**: 1848-52,
- Chaussabel, D., Jacobs, F., de Jonge, J., de Veerman, M., Carlier, Y., Thielemans, K., Goldman, M., Vray, B. (1999) CD40 ligation prevents *Trypanosoma cruzi* infection through interleukin-12 upregulation, *Infect Immun.*, **67**: 1929-34,
- Diehl, L., den Boer, A.T., Schoenberger, S.P., van der Voort, E.I., Schumacher, T.N., Melief, C.J., Offringa, R., Toes, R.E. (1999) CD40 activation *in vivo* overcomes peptide-induced peripheral cytotoxic T-lymphocyte tolerance and augments anti-tumor vaccine efficacy, *Nat Med.*, **5**: 774-9,
- Howard, L.M., Miga, A.J., Vanderlugt, C.L., Dal Canto, M.C., Laman, J.D., Noelle, R.J., Miller, S.D. (1999) Mechanisms of immunotherapeutic intervention by anti-CD40L (CD154) antibody in an animal model of multiple sclerosis, *J Clin Invest.*, **103**: 281-90,
- Kaiser, E. et coll. (1970) *Anal. Biochem.*, **34**, 595-598,
- Kikuchi, T., Moore, M.A., Crystal, R.G. (2000) Dendritic cells modified to express CD40 ligand elicit therapeutic immunity against preexisting murine tumors, *Blood*. **96**: 91-9,
- Kirk, A.D., Burkly, L.C., Batty, D.S., Baumgartner, R.E., Berning, J.D., Buchanan, K., Fechner, J.H., Jr., Germond, R.L., Kampen, R.L., Patterson, N.B., Swanson, S.J., Tadaki, D.K., TenHoor, C.N., White, L., Knechtle, S.J., Harlan, D.M. (1999) Treatment with humanized monoclonal antibody against CD154 prevents acute renal allograft rejection in non-human primates, *Nat Med.*, **5**: 686-93,
- Koopman W.J. and Gay, S. (1988) The MRL-*lpr/lpr* mouse. A model for the study of rheumatoid arthritis. *Scand. J. Rheumatol.* **75**, 284-289,
- Koppi, T.A., Tough-Bement, T., Lewinsohn, D.M., Lynch, D.H., Alderson, M.R. (1997) CD40 ligand inhibits Fas/CD95-mediated apoptosis of human blood-derived dendritic cells, *Eur J Immunol.*, **27**: 3161-5,
- Locksley et al. (2001) *Cell*, **104**, 487-501,

- Lode, H.N., Xiang, R., Pertl, U., Forster, E., Schoenberger, S.P., Gillies, S.D., Reisfeld, R.A. (2000) Melanoma immunotherapy by targeted IL-2 depends on CD4(+) T-cell help mediated by CD40/CD40L interaction, *J Clin Invest.*, **105**: 1623-30,
- Miga, A.J., Masters, S.R., Durell, B.G., Gonzalez, M., Jenkins, M.K., Maliszewski, C., Kikutani, H., Wade, W.F., Noelle, R.J. (2001) Dendritic cell longevity and T cell persistence is controlled by CD154-CD40 interactions, *Eur J Immunol.*, **31**: 959-965,
- Schattner, E.J., Mascarenhas, J., Bishop, J., Yoo, D.H., Chadburn, A., Crow, M.K., Friedman, S.M. (1996) CD4⁺ T-cell induction of Fas-mediated apoptosis in Burkitt's lymphoma B cells, *Blood*, **88**: 1375-82,
- Sotomayor, E.M., Borrello, I., Tubb, E., Rattis, F.M., Bien, H., Lu, Z., Fein, S., Schoenberger, S., Levitsky, H.I. (1999) Conversion of tumor-specific CD4+ T-cell tolerance to T-cell priming through *in vivo* ligation of CD40. *Nat Med.*, **5**: 780-7,
- Tong, A. W., B. Seamour, J. Chen, D. Su, G. Ordonez, L. Frase, G. Netto, and M. J. Stone. 2000. CD40 ligand-induced apoptosis is Fas-independent in human multiple myeloma cells. *Leuk Lymphoma* **36**:543-558.

REVENDICATIONS

1. Molécule multimérique, caractérisée en ce qu'elle répond à la formule générale suivante :

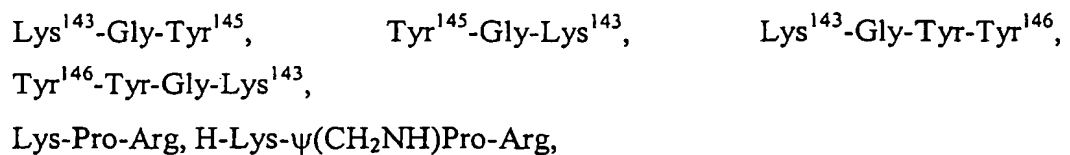


dans laquelle :

- n est égal à 3, 4, 5 ou 6,
- A est un groupe chimique, fonctionnalisé par au moins trois fonctions amines ou fonctions COOH ou fonctions SH ou fonctions S-Npys (S-nitro-pyridinesulfényle) ou fonctions S-Pys (S-pyridinesulfényle), et est notamment différent d'une protéine,
- X représente un groupe -D, -B-D ou -B(D)-D', dans lequel :
 - * B est un bras espaceur,
 - * -D et -D' représentent des peptides ou pseudo-peptides correspondant à une séquence dérivée d'un ligand, choisie parmi les résidus formant l'interface avec le récepteur du ligand, laquelle séquence est susceptible d'interagir avec le récepteur, ledit ligand étant choisi parmi les ligands de récepteurs de la superfamille du TNF, et notamment parmi les ligands suivants : EDA, CD40L, FasL, OX40L, AITRL, CD30L, VEGI, LIGHT, 4-1BBL, CD27L, LT α , TNF, LT β , TWEAK, APRIL, BLYS, RANKL et TRAIL

2. Molécule selon la revendication 1, caractérisée en ce que -D et -D' représentent des peptides dérivés du ligand du récepteur CD40 humain ou murin (CD40L), lesdits peptides appartenant à la séquence primaire du ligand CD40L de CD40 et dont le nombre d'acides aminés est compris entre 3 et 10.

3. Molécule selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que les peptides dérivés du ligand du récepteur CD40 humain ou murin (CD40L) sont choisis parmi les suivants :



$\text{Arg}^{200}\text{-Phe-Glu-Arg-Ile-Leu-Leu-Arg}^{207}$,
 $\text{Arg}^{207}\text{-Leu-Leu-Ile-Arg-Glu-Phe-Arg}^{200}$,
 $\text{Arg}^{200}\text{-Phe-Glu-Arg-Ile}^{204}$, $\text{Ile}^{204}\text{-Arg-Glu-Phe-Arg}^{200}$,
 $\text{Arg}^{203}\text{-Ile-Leu-Leu-Arg}^{207}$, $\text{Arg}^{207}\text{-Leu-Leu-Ile-Arg}^{203}$,
 $\text{Cys}^{218}\text{-Gly-Gln-Gln-Ser-Ile}^{223}$, $\text{Ile}^{223}\text{-Ser-Gln-Gln-Gly-Cys}^{218}$,
 $\text{Gly}^{200}\text{-Ser-Glu-Arg-Ile-Leu-Leu-Lys}^{207}$,
 $\text{Lys}^{207}\text{-Leu-Leu-Ile-Arg-Glu-Ser-Gly}^{200}$,
 $\text{Gly}^{200}\text{-Ser-Glu-Arg-Ile}^{204}$, $\text{Ile}^{204}\text{-Arg-Glu-Ser-Gly}^{200}$,
 $\text{Arg}^{203}\text{-Ile-Leu-Leu-Lys}^{207}$, $\text{Lys}^{207}\text{-Leu-Leu-Ile-Arg}^{203}$,
 $\text{Cys}^{218}\text{-Glu-Gln-Gln-Ser-Val}^{223}$, $\text{Val}^{223}\text{-Ser-Gln-Gln-Glu-Cys}^{218}$,

ou parmi des peptides hybrides constitués d'au moins deux acides aminés consécutifs de deux des séquences définies ci-dessus, notamment les peptides de séquences $\text{Arg}^{203}\text{-Ile}^{204}\text{-Tyr}^{145}\text{-Tyr}^{146}$ ou $\text{Arg}^{203}\text{-Ile}^{204}\text{-Tyr}^{146}\text{-Tyr}^{145}\text{-Gly}^{144}\text{-Lys}^{143}$,

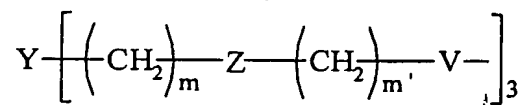
ou parmi des fragments des séquences susmentionnées,

les acides aminés pouvant être indifféremment de configuration L ou D.

4. Molécule multimérique selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que A présente une symétrie C_3 .

5. Molécule multimérique selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que :

- soit A est un radical branché de symétrie C_3 de formule générale suivante :

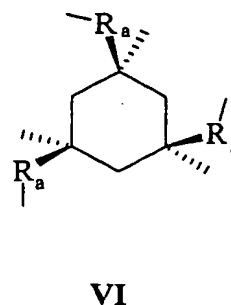
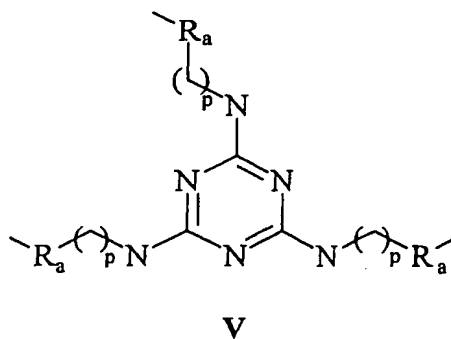
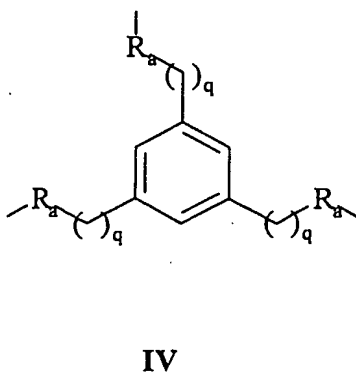
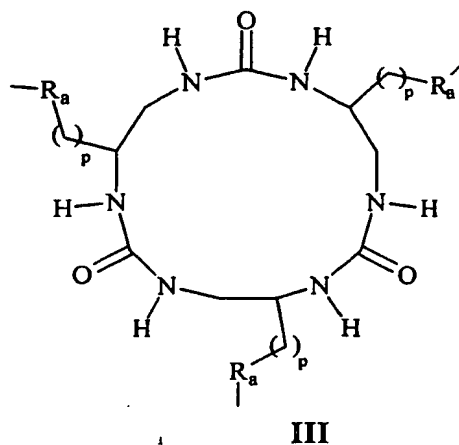
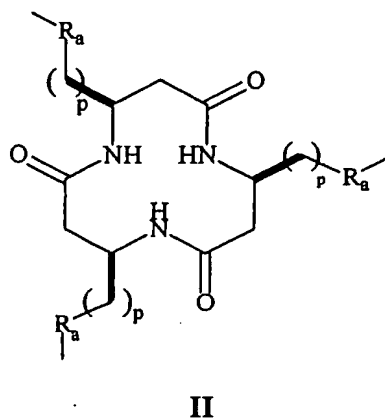
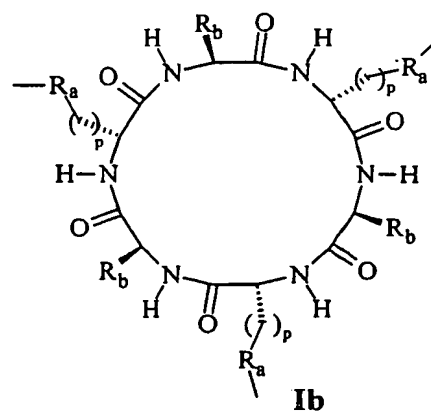
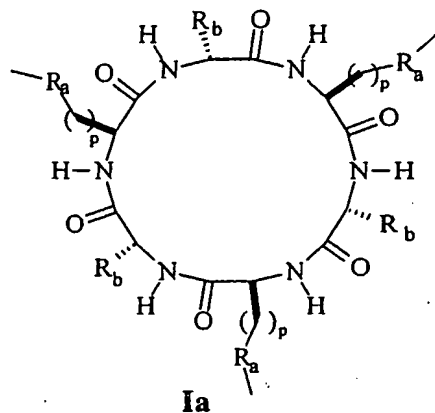


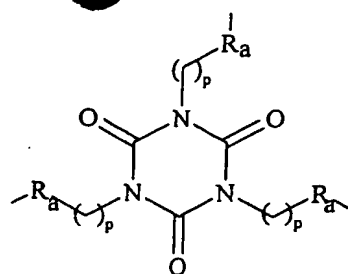
dans laquelle :

- * m et m' sont des nombres entiers compris de 1 à 5,
- * V représente un groupe -NH- ou -CO- formant une liaison amide avec X,
- * Z représente un atome d'oxygène ou un groupe CH_2 ,
- * Y représente soit un atome d'azote, soit un groupe R-C- soit un groupe R-CONH-C-, dans lesquels R peut être un groupe alkyle avec 1 à 10 atomes de carbone, un groupe alkényle avec 1 à 10 atomes de carbone, un groupe alkynyle avec 1 à 10 atomes de carbone, un groupe aryle avec 5 à 12 atomes de carbone, un groupe aralkyle avec 5 à 14 atomes de

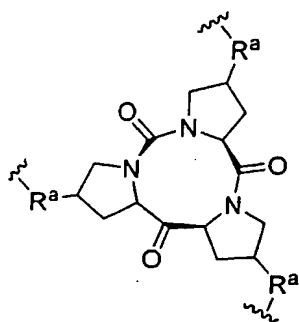
carbone ou un groupe hétéroaryle avec 1 à 10 atomes de carbone, lesdits groupes pouvant être non substitués ou substitués par 1 jusqu'à 6 substituants choisis parmi les groupes $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{CONH}_2$ ou alkoxy,

- soit A est un radical C_3 cyclique répondant à l'une des formules générales suivantes :

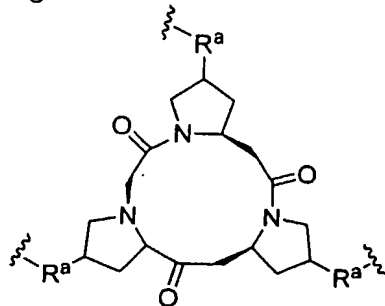




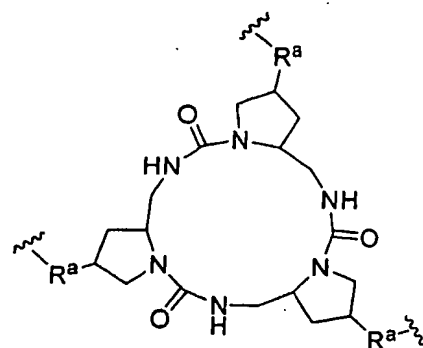
VIa



VIb



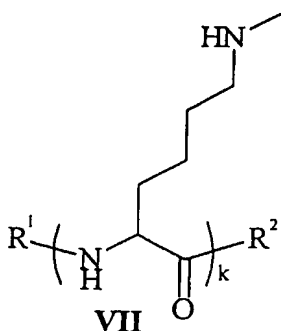
VIc



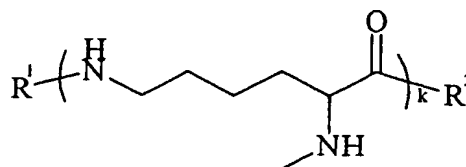
VIId

dans lesquelles :

- * R_a représente soit un groupe $-NH-$ soit un groupe $-CO-$ formant une liaison amide avec X,
 - * R_b représente la chaîne latérale d'un acide aminé protéinogénique,
 - * p est un nombre entier compris de 1 à 4,
 - * q est un nombre entier compris de 0 à 4,
- soit A est un radical branché non symétrique répondant aux formules générales suivantes :



VII



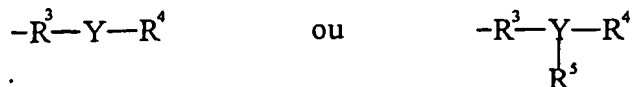
VIII

dans lesquelles :

- * k représente 3, 4, 5 ou 6,
- * R^1 représente soit un atome d'hydrogène, soit un résidu d'acide aminé choisi parmi les acides aminés protéinogéniques, soit un groupement $RCO-$, $ROCO-$ ou $RNHCO-$, R étant tel que défini ci-dessus,

- * R^2 représente soit un groupe $-NH_2$, soit un groupe $-NHR$, soit un résidu d'acide aminé choisi parmi les acides aminés protéinogéniques, R étant tel que défini ci-dessus,

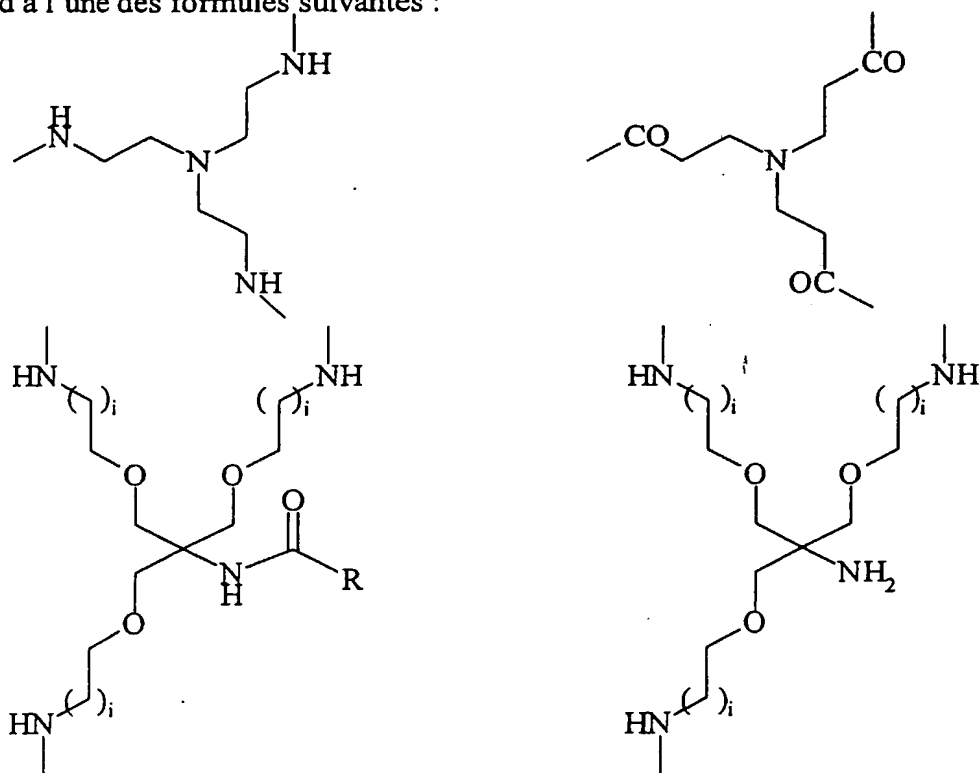
– B répond à l'une des formules générales suivantes :



dans lesquelles :

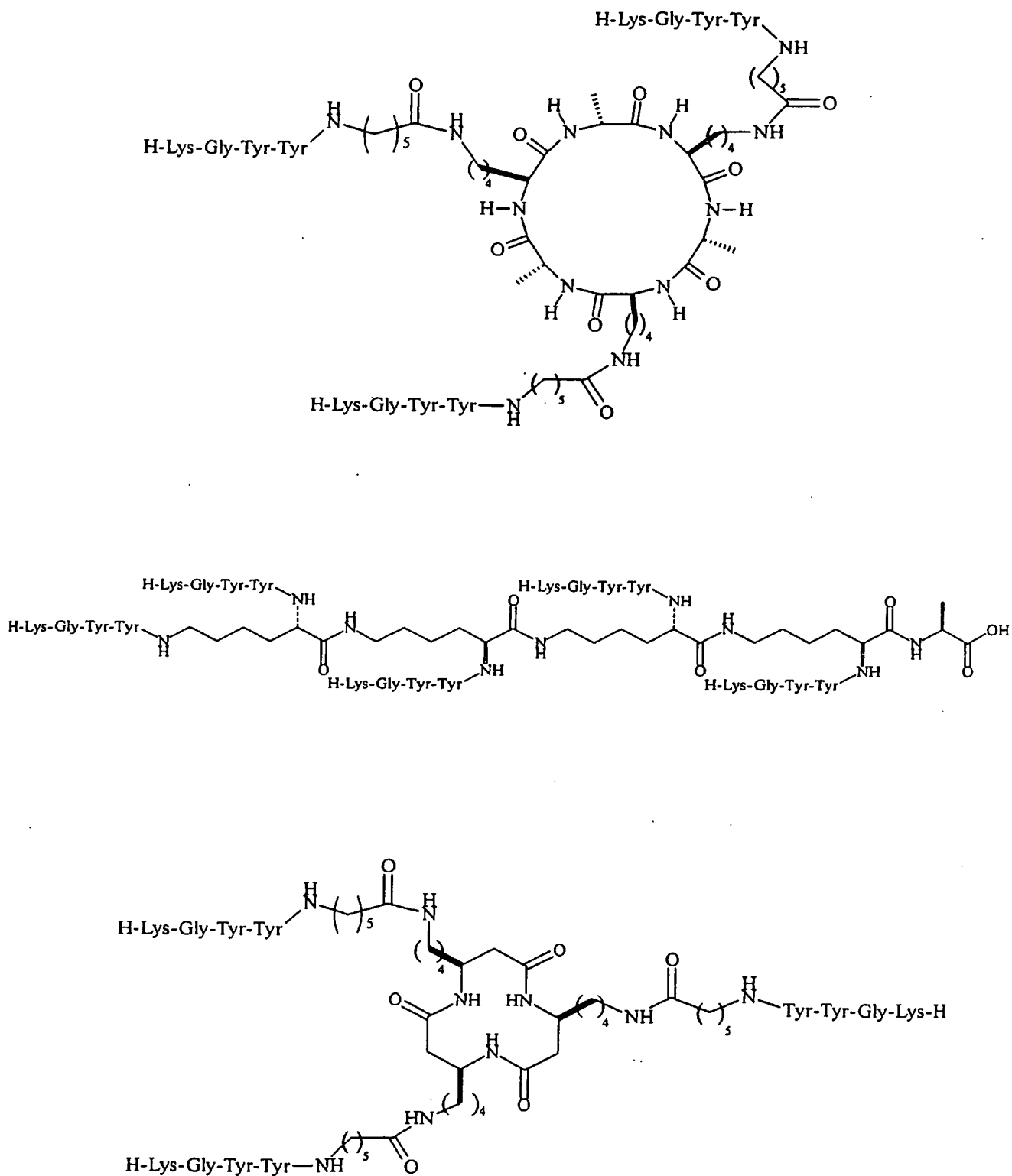
- * Y représente une chaîne alkyle C_1-C_{10} ou un groupement alkynyle ou alkenyle ou aryle ou aralkyle ou hétéroaryle,
 - * R^3 représente soit un groupe $-NH-$ lorsque V ou R_a est un groupe $-CO-$, soit un groupe $-CO-$ lorsque V ou R_a est un groupe $-NH-$,
 - * R^4 et R^5 représentent indépendamment l'un de l'autre un groupe $-CO-$ ou un groupe $-NH-$,
- -D et -D' sont des peptides ou pseudopeptides tels que définis dans la revendication 1 ou 2.

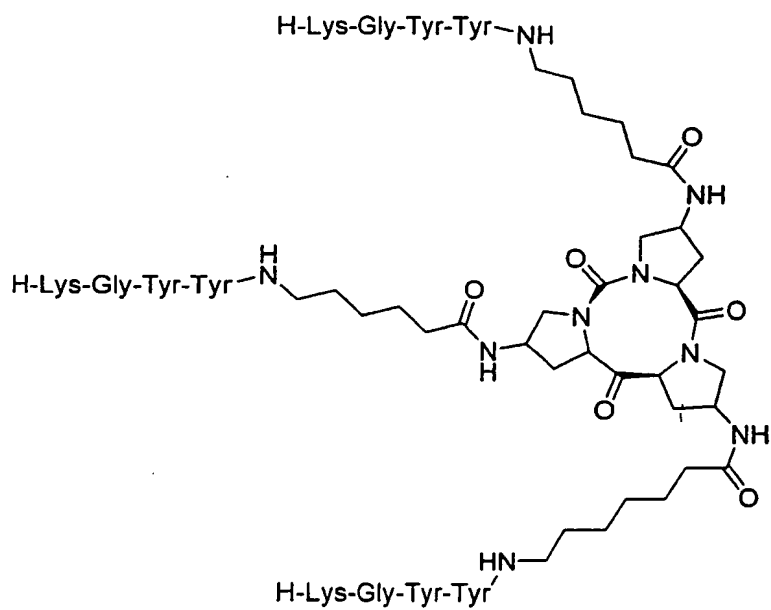
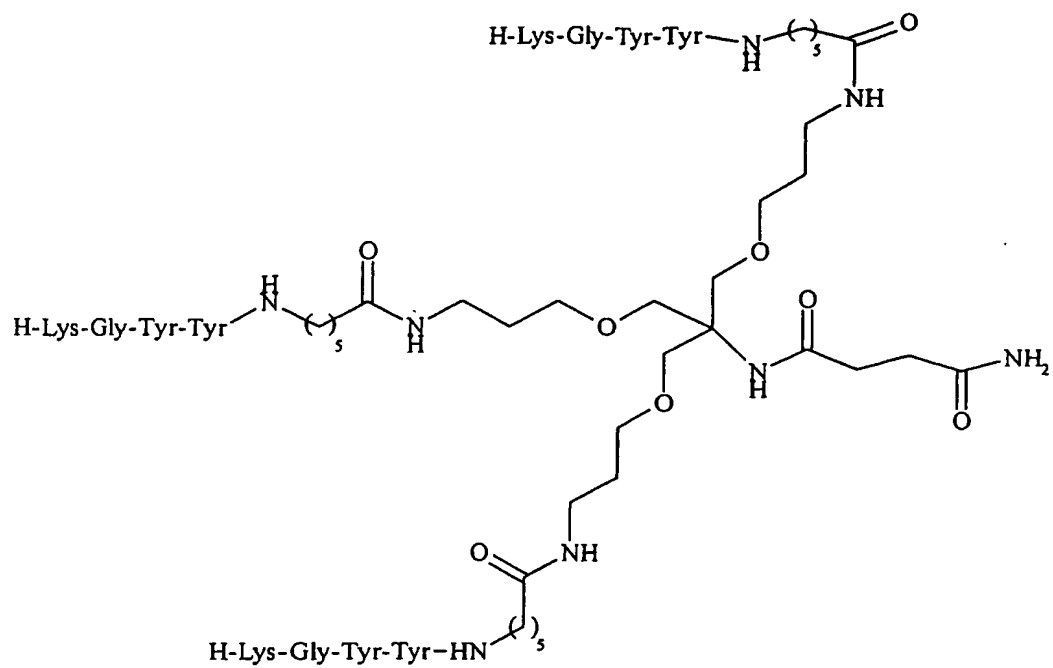
6. Molécule selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que A répond à l'une des formules suivantes :



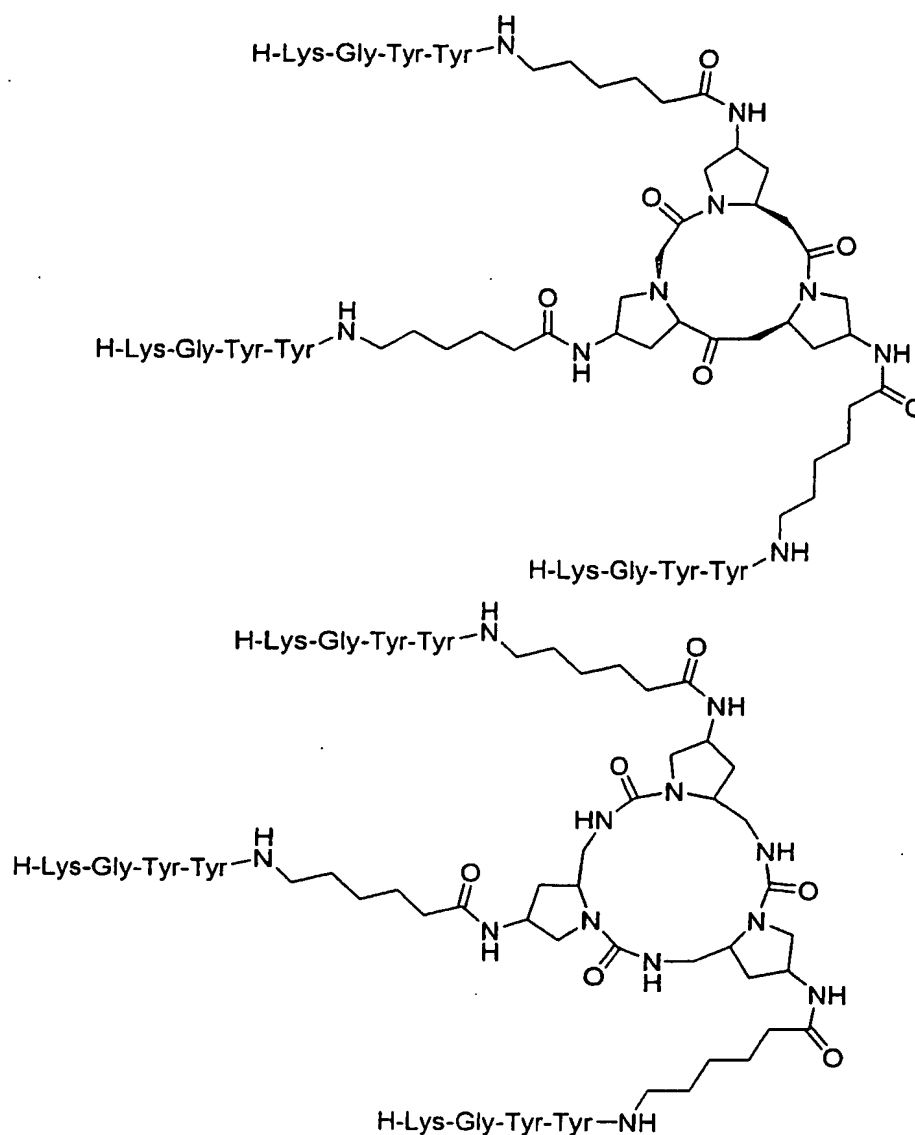
dans lesquelles i représente un nombre entier supérieur ou égal à 1.

7. Molécule selon l'une des revendications 1 à 6, de formule suivante :





59



8. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend, à titre de substance active une molécule multimérique selon l'une des revendications 1 à 7, en association avec un vecteur pharmaceutiquement acceptable.

9. Composition vaccinale, caractérisée en ce qu'elle comprend, à titre de substance active une molécule multimérique selon l'une des revendications 1 à 7, en association avec un adjuvant pharmaceutiquement acceptable.

10. Utilisation de molécules multimériques selon l'une des revendications 1 à 7, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies impliquant l'inhibition ou l'activation de la réponse immunitaire.

11. Utilisation selon la revendication 10, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies impliquant l'inhibition de la réponse immunitaire, telles que les rejets de greffes ou les maladies auto-immunes.

12. Utilisation selon la revendication 10, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies impliquant l'augmentation de la réponse immunitaire, telles que les cancers ou les infections parasitaires, bactériennes ou virales.

13. Procédé de préparation sur support solide d'une molécule multimérique, selon l'une des revendications 1 à 7, dans laquelle A est un radical C_3 cyclique et répond à l'une des formules Ia, Ib, II, VIb, VIc ou VId telles que définies dans la revendication 5, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- la formation d'un précurseur linéaire de A, lequel précurseur est constitué d'un enchaînement d'acides aminés formant une chaîne peptidique en croissance, synthétisée par des cycles successifs de couplage entre des résidus d'acides aminés N-protégés, dont trois portent un groupe R_a de type amine, et la fonction amine de la chaîne peptidique en croissance, et de déprotection, le premier résidu d'acide aminé étant accroché sur un support solide,
- la cyclisation du précurseur linéaire de A protégé susmentionné,
- le clivage des susdits groupes protecteurs, pour libérer les susdites fonctions amines protégées,
- le couplage des trois fonctions amines libérées avec un bras espaceur B N-protégé,
- la déprotection du bras espaceur B et le couplage des fonctions amines libérées du bras espaceur B, avec un peptide D déjà formé ou formé in situ par l'assemblage séquentiel des résidus d'acides aminés correspondant au peptide D, et
- le clivage de la molécule du support solide, après la suppression de tous les groupements protecteurs présents sur les chaînes latérales fonctionnalisées du peptide D, afin d'obtenir la molécule multimérique telle que définie dans l'une des revendications 1 à 7.

14. Procédé de préparation en solution d'une molécule multimérique, selon l'une des revendications 1 à 7, dans laquelle A est un radical C_3 cyclique et répond à l'une des formules Ia, Ib, II, VIb, VIc ou VId telles que définies dans la revendication 5, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- la formation d'un précurseur linéaire de A, lequel précurseur est constitué d'un enchaînement d'acides aminés formant une chaîne peptidique en croissance, synthétisée par des cycles successifs de couplage entre des résidus d'acides aminés N-protégés, dont trois portent un groupe R_a de type amine, et la fonction amine de la chaîne peptidique en croissance, et de déprotection,
- la cyclisation du précurseur linéaire de A protégé susmentionné,
- le clivage des susdits groupes protecteurs, pour libérer les susdites fonctions amines protégées,
- le couplage des trois fonctions amines libérées avec un peptide -D-B correspondant à un bras espaceur B lié à un peptide D protégé,
- la déprotection des groupements protecteurs présents sur le peptide D, afin d'obtenir la molécule multimérique telle que définie dans l'une des revendications 1 à 7.

15. Procédé de préparation d'une molécule multimérique selon l'une des revendications 1 à 7, dans laquelle A est un radical C_3 branché et répond à l'une des formules IV, V, VI ou VIa telles que définies dans la revendication 5, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- le couplage des trois fonctions amines du radical A de formule IV, V, VI ou VIa avec un bras espaceur B protégé,
- la déprotection du bras espaceur B,
- l'assemblage du bras espaceur B déprotégé avec des acides aminés protégés entrant dans la constitution d'un peptide D, par des cycles successifs de couplage, de purification et de déprotection des acides aminés susmentionnés,
- la déprotection du dernier acide aminé entrant dans la constitution du peptide D, afin d'obtenir la molécule multimérique telle que définie dans l'une des revendications 1 à 7.

16. Procédé de préparation sur support solide d'une molécule multimérique selon l'une des revendications 1 à 7, dans laquelle A est un radical branché non symétrique répondant à l'une des formules VII ou VIII telles que définies dans la

revendication 5, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- le greffage d'une lysine sur un support solide, chacune des deux fonctions amines de la lysine, respectivement en position α et ϵ , étant protégée respectivement par des groupes protecteurs différents et orthogonaux,
- l'allongement de la chaîne peptidique formée à partir de la lysine, à la longueur désirée, par couplages et déprotections successifs
 - * soit uniquement des fonctions amines en position α afin d'obtenir le radical A de formule VII, avec des fonctions amines protégées en position ϵ ,
 - * soit uniquement des fonctions amines en position ϵ afin d'obtenir le radical A de formule VIII, avec des fonctions amines protégées en position α ,
- le couplage des fonctions amines déprotégées en position ϵ dans le radical A de formule VII ou en position α dans le radical A de formule VIII, avec un bras B protégé,
- l'assemblage du bras espaceur B déprotégé avec un peptide D déjà formé ou formé in situ par l'assemblage séquentiel des résidus d'acides aminés correspondant au peptide D, et
- le clivage de la molécule ainsi obtenue du support solide, après la suppression de tous les groupements protecteurs présents sur les chaînes latérales fonctionnalisées du peptide D.

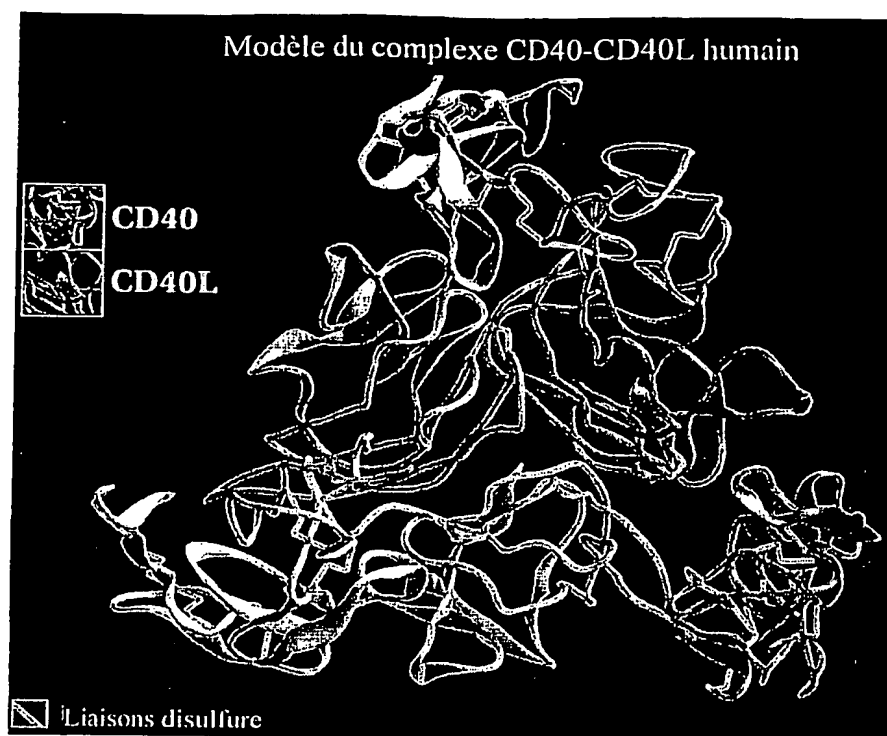


FIGURE 1A

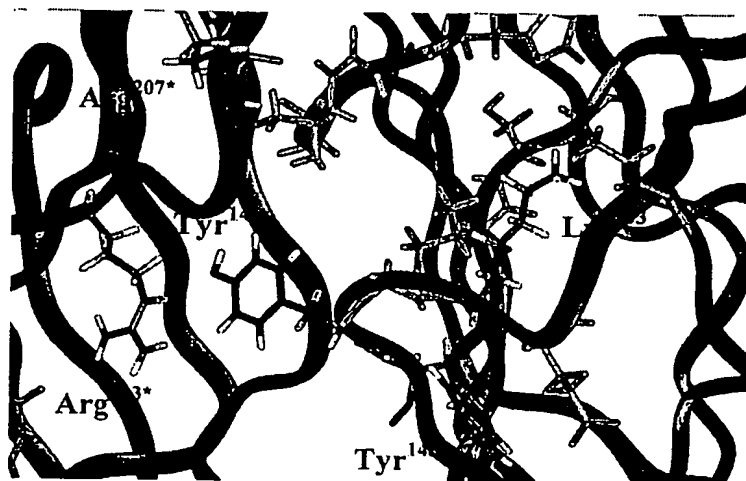


FIGURE 1B

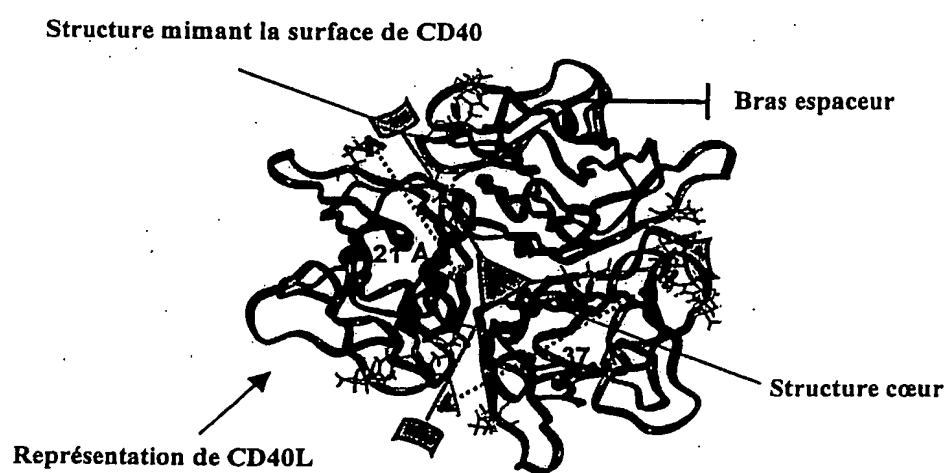


FIGURE 2

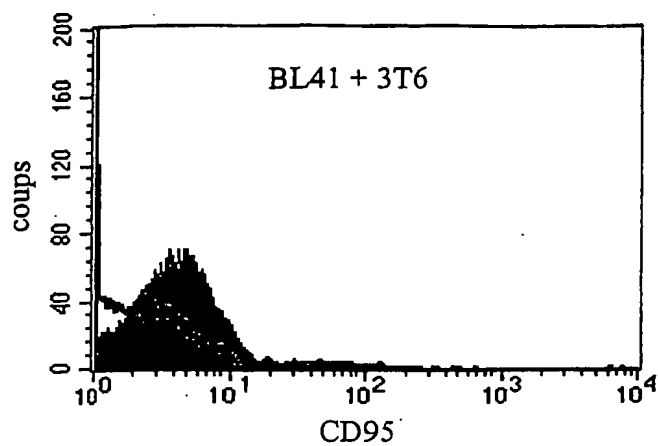


FIGURE 3A

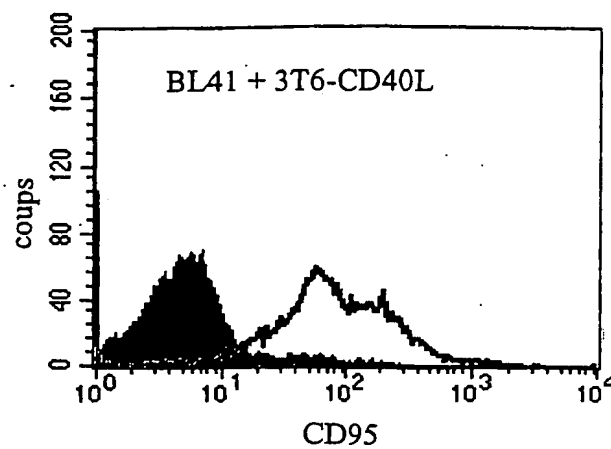


FIGURE 3B

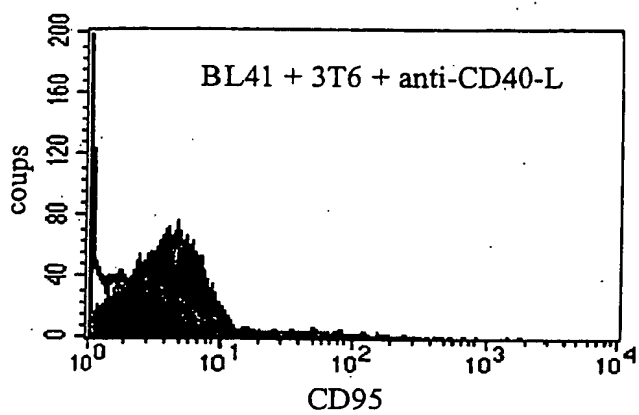


FIGURE 3C

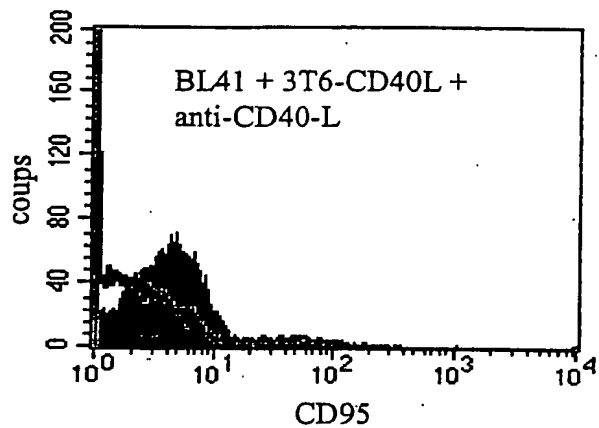


FIGURE 3D

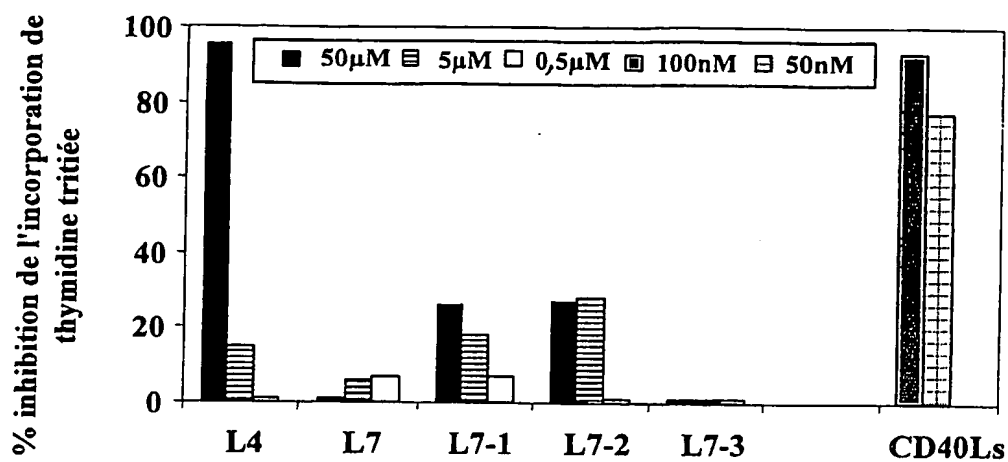


Figure 4A

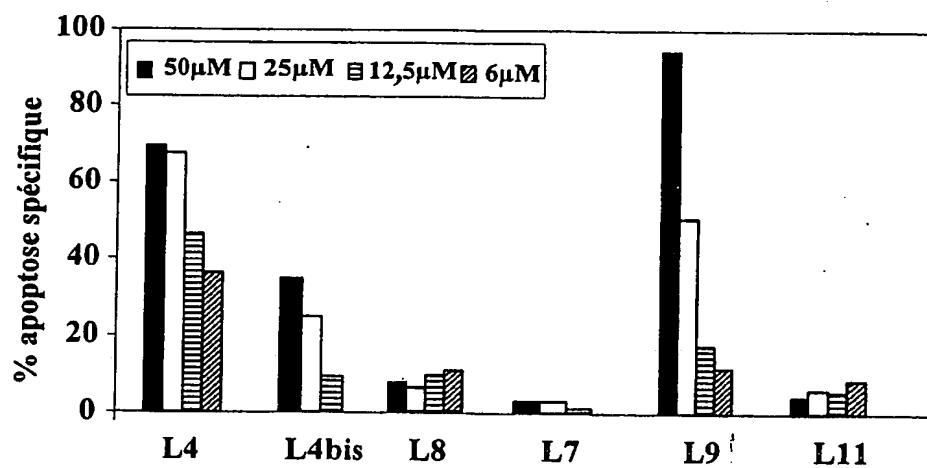
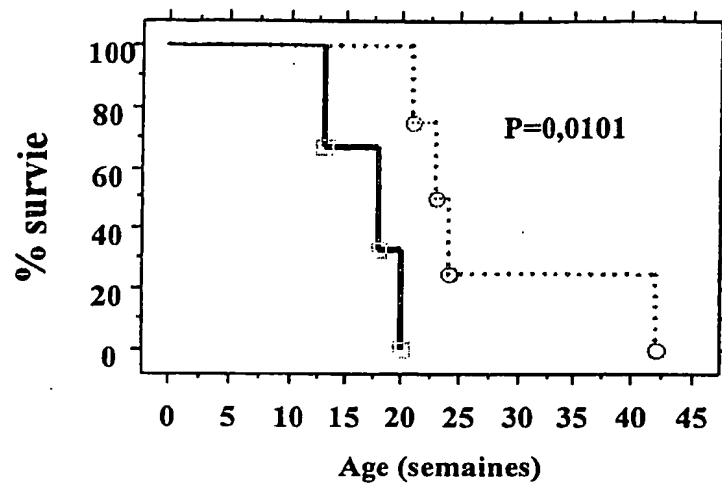


Figure 4B



□ PBS ■ L4

Figure 5A

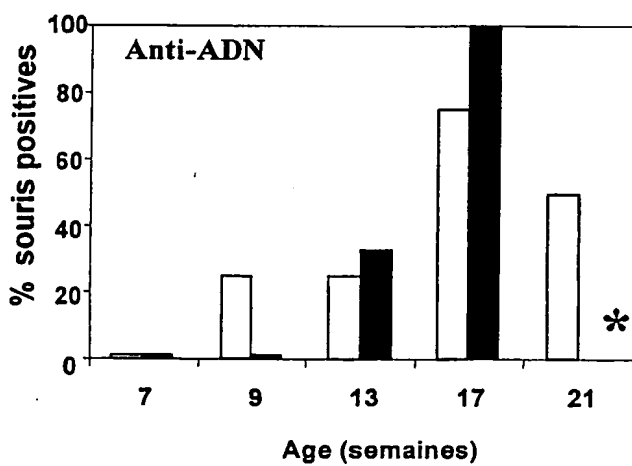


Figure 5B

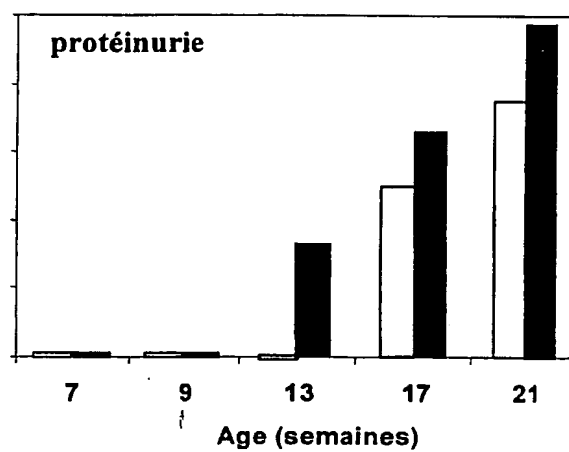


Figure 5C